

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**α -Synuclein-Oligomere beeinflussen die
exzitatorische synaptische Übertragung
durch prä- und postsynaptische
Mechanismen**

Sandra Hüls, geb. Paluch

aus

Dortmund, Deutschland

2014

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Martin Biel betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München,

.....
Sandra Hüls

Dissertation eingereicht am: 10.01.2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Martin Biel

2. Gutachter: Prof. Dr. Jochen Herms

Mündliche Prüfung am: 10.03.2014

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iii
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	vii
Widmung	viii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Neurodegenerative Erkrankungen	1
1.2 Synucleinopathien	2
1.2.1 Das idiopathische Parkinson-Syndrom (Morbus Parkinson)	3
1.2.2 Demenz mit Lewi-Körperchen (DLB)	6
1.3 α -Synuclein: Eigenschaften, Funktion, Pathophysiologie	6
1.3.1 Synucleinfamilie	6
1.3.2 Proteinstruktur	7
1.3.3 Physiologische Funktion von α -Synuclein	9
1.3.4 Aggregationsverhalten und Pathophysiologie	11
1.4 Elektrophysiologische Grundlagen	13
1.4.1 Neurotransmitter Glutamat und Glutamat-Rezeptoren	13
1.4.2 Ca^{2+} -Ionen als zelluläre Botenstoffe	18
1.4.3 Synaptische Neurotransmission im Hippokampus	18
1.4.4 Aufbau und Funktion der Synapse	19
1.4.5 Synaptische Plastizität	21
1.4.6 Historische Betrachtung der <i>Patch-Clamp</i> -Technik	22
1.5 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie	23
1.6 Zielsetzung	25
2 Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.2 α -Synuclein-Präparation und Aggregationsanalyse	26
2.2.1 Proteinexpression	26
2.2.2 Fluoreszenzmarkierung von α -Synuclein	27
2.2.3 Konfokale Molekülspektroskopie	28
2.2.4 Messaufbau	28
2.2.5 Justage und Messbedingungen	29

2.2.6	Analyseverfahren der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie	30
2.2.7	Aggregationsansatz	31
2.3	Primäre Zellkultur	33
2.3.1	Autaptische Kultur	33
2.4	Elektrophysiologie	36
2.4.1	<i>Patch-Clamp</i> -Elektroden	37
2.4.2	Aufbau des Messplatzes	37
2.4.3	Elektrische Eigenschaften der <i>Whole-Cell</i> -Konfiguration	38
2.4.4	Lösungen	40
2.4.5	Messung synaptischer Ströme in Hippokampusneuronen	40
2.4.6	Messprotokoll	45
2.4.7	Datenaufnahme und Auswertung	45
2.5	Vitalitätstest	46
2.6	Nachweis von Proteinen mittels Western Blot	47
2.7	Biotinylierung von Zellmembranproteinen	50
2.8	Synaptosomenpräparation	51
2.9	Ca²⁺-Imaging	52
2.9.1	Konfokale Mikroskopie	52
2.9.2	Der Fluoreszenz-Indikator Fluo-4 AM	53
2.9.3	Messung der zytosolischen Ca ²⁺ -Ionen in Dendriten und Synaptosomen	54
3	Ergebnisse	56
3.1	Aggregationsverhalten des α-Synucleins	56
3.1.1	Charakterisierung der Aggregatgröße mittels FIDA	57
3.2	Effekte von α-Synuclein-Monomeren und -Oligomeren auf die synaptische Übertragung	58
3.2.1	Stimulierte und spontane Neurotransmitterfreisetzung	59
3.2.2	Kurzzeitplastizität	63
3.3	Effekt der α-Synuclein-Oligomere auf den Kalzium-Haushalt	65
3.3.1	Spines und Dendriten	65
3.3.2	Synaptosomen	66
3.4	Rezeptorendichte	67
3.5	Toxizität und Exzitotoxizität	68

4	Diskussion	70
4.1	Aggregationsverhalten von α -Synuclein	70
4.2	Einfluss der Oligomere auf die synaptische Übertragung	72
4.3	Veränderungen des Ionenhaushalts und der Neurotoxizität	77
4.4	Implikation der Studienergebnisse für die Therapie von Synucleinopathien	79
5	Zusammenfassung	81
6	Literaturverzeichnis	83
6.1	Zitierte Literatur	83
6.2	Eigene Literatur:	92
7	Danksagung	93

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Erste Seite von Parkinson's klassischen Werk: An Essay onthe shaking palsy.	1
Abb. 2: Lewy-Körperchen (LK) und Lewy-Neuriten (LN) im histologischen Bild bei Morbus Parkinson.....	5
Abb. 3: Schematische Darstellung der humanen α -Synuclein-Domänen.....	9
Abb. 4: Agregationsverhalten von Proteinen	13
Abb. 5: L-Glutaminsäure	14
Abb. 6: Permeabilität des NMDA-Rezeptors	16
Abb. 7: Non-NMDA-Rezeptoren	17
Abb. 8: Lokalisation des Hippokampus im Gehirn der Maus (Quelle)	19
Abb. 9: Synapse	20
Abb. 10: Messaufbau des Insight Readers	29
Abb. 11: 2D-FIDA- und SIFT-Methode	31
Abb. 12: Autaptische Kultur	35
Abb. 13: Generierung der <i>Whole-Cell</i> -Konfiguration.....	37
Abb. 14: Messaufbau	39
Abb. 15: Mini-Template.....	42
Abb. 16: EPSC und Stimulationsprotokoll	42
Abb. 17: Stimulationsprotokoll der Amplituden-Messung	43
Abb. 18: Stimulationsprotokoll für die Doppelpulsversuche	44
Abb. 19: MTT-Farbstoffumwandlung	46
Abb. 20: Isolierung von Zellmembranproteinen.....	51
Abb. 21: Konfokale Mikroskopie	53
Abb. 22: Struktur von Fluo-4.....	54
Abb. 23: SIFT-Analyse	56
Abb. 24: Western Blot der verschiedenen α -Synuclein-Oligomer-Präparationen	57
Abb. 25: FIDA-Aggregatgröße	58
Abb. 26: Effekt der α -Synuclein-Präparationen auf die AMPA–Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission.....	60
Abb. 27: Effekt der α -Synuclein-Präparationen auf die NMDA–Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission.....	62
Abb. 28: Kurzzeitplastizität	64
Abb. 29: Intrazelluläres Ca^{2+} in Dendriten unter extrazellulärer Applikation von α -Synuclein- Oligomer-	66
Abb. 30: Einfluss der α -Synuclein-Oligomere auf Synaptosomenpräparation	67
Abb. 31: Proteinlevel von AMPA-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren.....	68
Abb. 32: Zytotoxischer Effekt der D1-Oligomer-Präparation in primären Neuronenkulturen	69

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Aggregations-Protokolle.....	32
Tab. 2: DMEM (5 % FBS) und NBA-Medium	35
Tab. 3: DMEM-Enzymlösung und 0,01 M PB-Puffer	35
Tab. 4: HBSS-Puffer und FUDR-Lösung	36
Tab. 5: EZL für non-NMDA-Ströme und EZL für NMDA-Ströme	40
Tab. 6: IZF für (non)-NMDA-Ströme	40
Tab. 7: Probenpuffer und 20xMOPS-Laufpuffer	49
Tab. 8: Transferpuffer und 0,01 M PB-Puffer	49
Tab. 9: Phosphatpuffer mit Tween (PBST) und Alkalischer Puffer	49
Tab. 10: NBT-Stock und BCIP-Stock	50
Tab. 11: Auswertung der FIDA-Analyse	58
Tab. 12: AMPA-Rezeptor-vermittelte EPSCs und sEPSCs	61
Tab. 13: EPSC und sEPSC der NMDA-Rezeptoren	63

Widmung

Für meine beiden Männer,
Jonas und Ralf.

Abkürzungsverzeichnis

A β	Amyloid- β -Peptid
AD	Morbus Alzheimer, Alzheimer Demenz
AK	Antikörper
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat
AP	Aktionspotential
AS	Aminosäure
BCIP	5-Bromo-4-chloro-indolylphosphat
[Ca ²⁺] _e	Extrazelluläre Kalzium-Konzentration
[Ca ²⁺] _i BSA	Intrazelluläre Kalzium-KonzentrationBovines Serumalbumin
CJD	Creutzfeldt-Jakob-Krankheit
C _m	Membrankapazität
CNQX	6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion
CPP	Engl. <i>Counts Per Particle</i> , mittlere Helligkeit der Partikel
CSP α	Cystein-Strang-Protein α
DAG	Diacylglycerin
DLB	Engl. <i>Dementia With Lewy Bodies</i> , Demenz mit Lewy-Körperchen
DMEM	Engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , standardisiertes Zellkulturmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPSC	Engl. <i>Excitatory Postsynaptic Current</i> , exzitatorischer postsynaptischer Strom
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EZL	Extrazellulärflüssigkeit
FBS	Engl. <i>Fetal Bovine Serum</i> , fötales Rinderserum
FCS	Engl. <i>Fluorescence Correlation Spectroscopy</i> , Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
Fe	Eisen
FeCl ₃	Eisen (III)-Chlorid
FIDA	Engl. <i>Fluorescence Intensity Distribution Analysis</i> , Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Histogramm
FRET	Engl. <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i> , Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GABA	γ -Amino-Buttersäure
h	Engl. <i>hour(s)</i> , Stunde(n)
HBSS	Engl. <i>Hank's Balanced Salt Solution</i> , standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur

HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
Itot	Gesamtintensität der Probe (FCS)
IZF	Intrazellulärflüssigkeit
kb	Kilobasen (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LBD	Engl. <i>Lewy Body Disease</i> , Lewy-Körperchen-Erkrankung
LK	Lewy-Körperchen
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LN	Lewy-Neurit
LTP	Engl. <i>Long Term Potentiation</i> , Langzeitpotenzierung
M	Molar
min	Minute(n)
μM	Mikromolar
mM	Millimolar
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
MSA	Multiple Systematrophie
mV	Millivolt
N	Partikelzahl
NBT	Nitroblau-tetrazoliumchlorid
nM	Nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
NP-40	Detergens NP-40, Octylphenoxypolyethoxyethanol
PBS	Engl. <i>Phosphate Buffered Saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDL	Poly-D-Lysin
PFI	Engl. <i>Partially Folded Intermediate</i> , partiell gefalteter Intermediate
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PPD	Engl. <i>Paired pulse depression</i> , Doppelpulserniedrigung
PPF	Engl. <i>Paired pulse facilitation</i> , Doppelpulsverstärkung
Pr	Engl. <i>Probability of release</i> , Freisetzungswahrscheinlichkeit
PrP	Prionprotein
Pvr	Engl. <i>Probability of vesicular release</i> , vesikuläre Freisetzungswahrscheinlichkeit
Rm	Membranwiderstand
RP	Engl. <i>Reserve Pool</i> , Reserve-Pool
rpm	Engl. <i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute

RRP	Engl. <i>Readily Releasable Pool</i> , Pool freisetzungsbereiter Vesikel
Rs	Serienwiderstand
RT	Raumtemperatur
SDS	Engl. <i>Sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat, Detergens
SEM	Engl. <i>Standard Error of the Mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
sEPSC	Engl. <i>Spontaneous Excitatory Postsynaptic Current</i> , spontaner exzitatorischer postsynaptischer Strom
SIFT	Engl. <i>Scanning for Intensely Fluorescent Targets</i> , Scannen nach hochintens fluoreszierenden Zielstrukturen
Tab.	Tabelle
tDiff	Mittlere Diffusionszeit der Partikel in der FCS
V/V	Volumen pro Volumen (Volumenprozent)
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZNP	Zentrum für Neuropathologie und Prionforschung
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

Dieser einleitende Teil behandelt die neurodegenerativen Erkrankungen im Allgemeinen und dabei die Synucleopathien im Besonderen. Außerdem werden das beteiligte Gen, α -Synuclein, sowie die verwendeten Methoden wie die *Patch-Clamp*-Technik und die konfokale Mikroskopie beschrieben. Der erste Abschnitt schließt mit der Zielsetzung dieser Arbeit. Im zweiten Kapitel werden die verwendeten Methoden dargestellt. Im darauffolgenden Abschnitt werden die Resultate der elektrophysiologischen und biochemischen Untersuchungen erläutert. Diese Ergebnisse und ihre Relevanz für die Parkinson-Erkrankung werden im Kapitel 4 diskutiert. Im letzten Abschnitt schließlich werden die Hauptkenntnisse dieser Arbeit zusammengefasst.

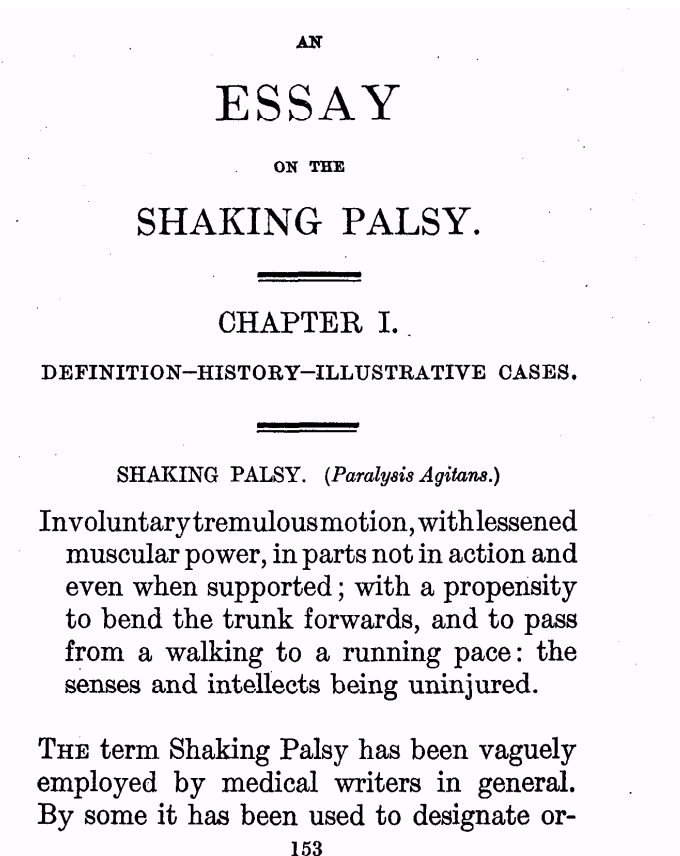


Abb. 1: Erste Seite von Parkinson's klassischen Werk: *An Essay on the shaking palsy*.

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Der Psychiater Alois Alzheimer (1864-1915) beschrieb 1906 die häufigste neurodegenerative Erkrankung: eine Erkrankung des Gehirns, die hauptsächlich Menschen höheren Alters betrifft und mit einem fortschreitenden Verlust der mentalen Fähigkeiten verbunden ist. Dieses Krankheitsbild wird seitdem als Morbus Alzheimer bezeichnet (Kraepelin 1910). Die

zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung wurde im Jahre 1817 vom englischen Arzt James Parkinson beschrieben. Die Symptome, die Parkinson in „An Essay on the Shaking Palsy“ erläuterte, sind unter dem Namen Morbus Parkinson (MP) oder idiopathisches Parkinson bekannt.

Die Ätiologie und Pathophysiologie dieser neurodegenerativen Erkrankungen sind noch nicht vollständig geklärt. Die meisten neurodegenerativen Erkrankungen zeichnen sich sowohl durch die Bildung als auch durch die Ablagerung von Proteinaggregaten aus. Diese Aggregate werden als krankheitsspezifisch und fibrillär nachgewiesen.

Zu diesen neurodegenerativen Erkrankungen zählen nicht nur Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson, sondern auch die Creutzfeldt-Jakob-Krankheit oder Morbus Huntington. Bei allen Erkrankungen können Proteinaggregate nachgewiesen werden. Bei Alzheimer-Patienten zeigen sich dementsprechend pathologische extrazelluläre Ablagerungen des Amyloid- β -Peptides (kurz A β) und intrazelluläre fibrilläre Aggregate des Tau-Proteins. Bei Prionkrankheiten können pathologische Aggregate des Prionproteins gefunden werden, beim Morbus Huntington zeigt sich pathologisch aggregiertes Huntingtin und bei Synucleopathien wie Morbus Parkinson, Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB) und der multiplen Systematrophie (MSA) bilden sich pathologische α -Synuclein-Aggregate (Koo et al. 1999; Hardy and Selkoe 2002; Muchowski 2002; Aguzzi and Haass 2003; Ross and Poirier 2004; Haass and Selkoe 2007; Högen 2009).

Die Proteinablagerungen selbst sowie deren Vorstufen (wie etwa die sogenannten löslichen Oligomere), scheinen die krankheitsassoziierte Nervenzellschädigung bei neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer oder dem Morbus Parkinson zu induzieren (Aguzzi and Haass 2003; Caughey and Lansbury 2003). Der Nachweis der pathologischen Proteinaggregate ist der Goldstandard in der Diagnostik dieser Erkrankungen (Lowe 1998). Es wird vermutet, dass diverse Mutationen, biochemische Modifikationen und Änderungen im Expressionsmuster der verschiedenen Proteine zu deren pathologischen Aggregationen führen (Soto 2003; Högen 2009).

1.2 Synucleinopathien

Beim MP können verschiedene Symptome beobachtet werden:

- die Verlangsamung der Bewegungsabläufe als Folge einer organischen Hirnerkrankung (Bradykinese),
- eine gesteigerte Grundspannung der Skelettmuskulatur, die sich durch charakteristische Steifigkeit bei passiven Bewegungsabläufen äußert (Rigor),

- ein Ruhetremor mit 4-6 Hz sowie
- eine Störung der Stellreflexe.

In ca. 90 % der Fälle sind diese sogenannten Parkinson-Symptome tatsächlich durch einen Morbus Parkinson verursacht. In den übrigen 10 % liegen sekundäre Ursachen zugrunde (Jellinger 1996).

Der MP gehört zu den *Synucleinopathien*. Diese Gruppe von Erkrankungen ist gekennzeichnet durch fibrilläre, zytoplasmatische α -Synuclein-Aggregate (sogenannte Lewy-Körperchen, LK) in Neuronen oder Gliazellen und durch Zytoplasmainschlüsse (Papp-Lantos-Körper) (Trojanowski et al. 1998; Spillantini and Goedert 2000; Goedert 2001; Marti et al. 2003). Desweiteren findet man α -Synuclein-positive Einschlüsse auch in Neuriten, sogenannte Lewy-Neuriten (LN) (Dickson et al. 1991; Braak et al. 1999). Die bekannteste Synucleinopathie ist der Morbus Parkinson. Neuere Studien zeigen, dass neben dem idiopathische Parkinson-Syndrom (Morbus Parkinson) sehr viele neurodegenerative Erkrankungen zu den Synucleinopathien gezählt werden müssen, wie etwa die multiple Systematrophie (MSA) und die Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB), sowie die zerebrale Eisenablagerung Typ I, vormals als Hallervorden-Spatz Syndrom bekannt oder auch die diffuse Lewy-Körperchen-Erkrankung (engl. *Lewy Body Disease*, LBD) (Spillantini et al. 1998; Spillantini and Goedert 2000; Jellinger 2003; Högen 2009).

1.2.1 Das idiopathische Parkinson-Syndrom (Morbus Parkinson)

Das idiopathische Parkinson-Syndrom (IPS) ist eine stetig progrediente neurodegenerative Erkrankung, deren Auftreten typischerweise in einem Lebensalter von 50 bis 60 Jahren liegt, wobei die Prävalenz mit steigendem Alter, insbesondere bei über 65-Jährigen, zunimmt (Evers and Obladen 1994). Es gilt als die häufigste neurodegenerativ bedingte Bewegungsstörung (Goedert 2001), von der ca. 1 bis 3,5 % aller Menschen in Deutschland betroffen sind (de Rijk et al. 1997; Forman et al. 2005; von Campenhausen et al. 2005).

Neuropathologisch wird beim Morbus Parkinson (MP) im *ventrolateralen* Teil der *Substantia nigra pars compacta* eine fortschreitende Depigmentierung und der Verlust dopaminerger Neurone beobachtet (Fearnley and Lees 1991; Lang and Lozano 1998).

Eine eindeutige Diagnose des Morbus Parkinson kann nur *post mortem* durch eine neuropathologische Untersuchung mit dem Nachweis von zytoplasmatischen α -Synuclein-positiven Einschlusskörperchen in den vulnerablen Neuronenpopulationen gestellt werden. Die spindel- bis fadenähnlichen LN formieren sich im neuronalen Perikaryon zu kugelförmigen LK (Forno 1996; Lewy, 1912). Bei der Hämatoxilin-Eosin-Färbung zeigen

sich LK als kugelige, 8-30 µm große Einschlusskörperchen, bei denen man lichtmikroskopisch eine Cor-Halo-Struktur mit einem hyalinen, eosinophilen Kern sowie einer umgebenden feinen laminären Ringstruktur erkennt (Jellinger 2003).

Zusätzlich zu den sphärischen, zytoplasmatischen Einschlusskörperchen können in den Neuriten α-Synuclein-positive Ablagerungen, die sogenannten Lewy-Neuriten (LN), detektiert werden (Abb. 2). Hierbei kann anhand der Verteilung von LK und LN in den unterschiedlichen Gehirnarealen das Stadium der Erkrankung bestimmt werden (Braak et al. 1999).

Heiko Braak hat eine neuropathologische Klassifikation vorgeschlagen, die auf der präklinischen Phase von frühen Einschlüssen im motorischen Kern des *Nervus vagus* bzw. des *Nervus glossopharyngeus* sowie im anterioren *olfactorischen Nucleus* basiert. Dies gründet auf seiner Hypothese, dass sich die LK- und LN-Pathologien im Verlauf der Erkrankung vom Hirnstamm über das Mittelhirn und den *entorhinalen Kortex* bis in verschiedene *neocorticale* Gehirnareale hin ausbreiten (Braak et al. 1999). Im Gegensatz zu dieser Verbreitung der pathologischen α-Synuclein-Einschlüsse betrifft der Neuronenverlust am stärksten die dopaminergen Neurone der *Substantia nigra pars compacta*. Durch den damit einhergehenden Dopaminmangel kommt es zu Veränderungen im *subcortical* gelegenen *nigro-striatalen* Regulationssystem, welche zu einer pathophysiologischen Dysfunktion in der direkten und indirekten sensomotorischen Basalganglienschleife führen. Bei einem Verlust von mehr als 50-60 % der dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra pars compacta* bildet sich das klinische Erscheinungsbild des MP aus (Becker et al. 2002). Zu den ersten Krankheitszeichen gehören Störungen der Riechfunktion, des Schlafverhaltens, des Vegetativums oder eine depressive Verstimmung (Becker et al. 2002). Häufig wird auf der Basis dieser Symptome nicht an das Vorliegen eines Morbus Parkinson gedacht. Oft entwickeln sich erst in späteren Stadien die klassischen Leitsymptome des MP wie Ruhetremor, Rigor, Bradykinese bzw. Akinese, kognitive Defizite sowie eine posturale Instabilität.

Die genaue Pathophysiologie der Degeneration dopaminerge Neurone beim MP ist bis heute noch immer unverstanden. Bekannt ist jedoch, dass eine direkte Exposition der dopaminergen Nervenzellen gegenüber Neurotoxinen wie MPTP, Herbiziden oder Pestiziden, einen pathophysiologischen Mechanismus in Gang setzt, der zu einem ähnliches Krankheitsbild wie dem MP führt (Winklhofer et al. 2008). Jedoch findet man bei solchen Fällen keine für den Morbus Parkinson typischen α-Synuclein-Aggregate.

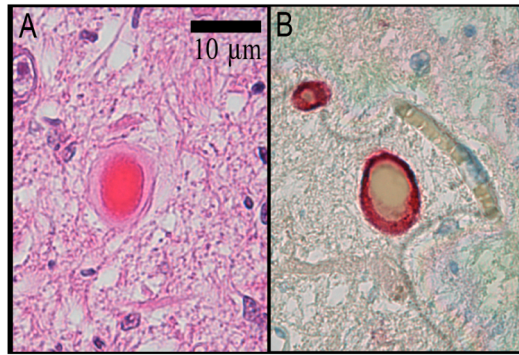


Abb. 2: Lewy-Körperchen (LK) und Lewy-Neuriten (LN) im histologischen Bild bei Morbus Parkinson.

A Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) eines pigmentierten Neurons aus dem Hirnstamm mit einem intrazellulären, zytosolischen Lewy-Körperchen.

B Immunhistochemische Anfärbung zweier α -Synuclein-positiver Lewy-Körperchen und eines Lewy-Neuriten mit dem Antikörper 15G7 (APAAP-Reaktion; Bilder S. Hüls, ZNP München).

Bei 5 % der Parkinson-Patienten liegt eine monogenetische Ursache vor und man spricht von einem familiären MP. Bisher konnten 13 verschiedene Gen-Loci beschrieben werden, welche mit dem familiären MP assoziiert werden (Park 2 bis Park 13 mit den bereits identifizierten Genen für Park 2, 5, 6, 7, 8, 9 und 13) (Gasser 2003; Mizuno et al. 2008; Winklhofer et al. 2008; Högen 2009). Im überwiegenden Teil handelt es sich hier um Gene, deren Mutationen und Deletionen zu Störungen des Proteasoms oder der Mitochondrienfunktion führen. Die Störungen werden über intrazelluläre Signalwege hervorgerufen. Solche Funktionsverluste bedingen den Nervenzelluntergang z.B. durch oxidativen Stress, durch einen Mangel an Energieträgern oder durch einen gestörten Proteinabbau (Winklhofer et al. 2008).

Bei allen genetisch bedingten Fällen des Morbus Parkinson ähnelt sich der klinische Phänotyp, wobei jedoch neuropathologische Unterschiede bestehen. Insbesondere zeigen sich nicht bei allen Formen des familiären MP α -Synuclein-Aggregate. Somit zählen die familiären oder neurotoxinbedingten Formen des MP nicht zu dem idiopathischen bzw. sporadischen MP sondern gründen eine eigene Gruppierung. Dennoch sind diese sehr seltenen toxisch ausgelösten Parkinson-Syndrome bzw. die familiäre Form des Morbus Parkinson sehr wichtig für das pathogenetische und pathophysiologische Verständnis des idiopathischen Morbus Parkinson.

Einen entscheidenden Durchbruch für das Verständnis des MP stellt die Identifikation eines Hauptbestandteils der LK, des synaptischen Proteins α -Synuclein, dar (Winklhofer et al. 2008). Dieses Protein ist pathophysiologisch fraglos bedeutsam, da Punktmutationen im α -Synuclein-Gen zu einer *autosomal-dominant* vererbten Variante des MP führen (Polymeropoulos et al. 1997; Krüger et al. 1998). Bis heute wurden drei verschiedene

Punktmutationen innerhalb des α -Synuclein-Gens beschrieben (Polymeropoulos et al. 1997; Krüger et al. 1998; Zarranz et al. 2004) sowie Duplikation bzw. Triplikation des α -Synuclein-Gens. Letzteres geht mit einer höheren Gendosis einher und gilt als auslösender Faktor der Erkrankung (Singleton et al. 2003; Ibanez et al. 2004; Zarranz et al. 2004).

1.2.2 Demenz mit Lewi-Körperchen (DLB)

Die DLB ist eine der häufigsten dementiellen ZNS-Erkrankungen, deren Prävalenz mit dem Alter stark zunimmt. Aufgrund der demographischen Entwicklung ist mit einem Anstieg bis zum Jahr 2040 in den industrialisierten Ländern zu rechnen. Die DLB ist nach der Alzheimer'schen Krankheit die zweithäufigste Ursache einer Demenz. Parkinson-Demenz und DLB sind wahrscheinlich zwei unterschiedliche phänotypische Manifestationen des gleichen Krankheitsprozesses. Zur klinischen Unterscheidung wird die „1-Jahres-Regel“ angewendet: Eine Demenz, die innerhalb von 12 Monaten nach Bestehen eines Parkinson-Syndroms (motorische Symptome wie Tremor, Rigor und Bradykinesie) auftritt, wird als DLB diagnostiziert. Es existieren allerdings keine neuropathologischen Kriterien, die eine Unterscheidung zwischen Parkinson-Demenz, Morbus Parkinson ohne Demenz und DLB zulassen. Auf neuropathologischer Ebene finden sich bei Patienten mit klinisch diagnostizierter Parkinson-Demenz bzw. DLB Heterogenitäten hinsichtlich des Verteilungsmusters und der Dichte der Lewy-Körper-Pathologie. Gelegentlich zeigen sich auch Überlappungen mit vaskulären Läsionen und Veränderungen, die einer Alzheimerpathologie entsprechen.

1.3 α -Synuclein: Eigenschaften, Funktion, Pathophysiologie

1.3.1 Synucleinfamilie

Das humane α -Synuclein ist ein kleines synaptisches Protein. Es macht ca. 1 % der Gesamthirnproteinmenge aus (Iwai et al. 1995) und ist mit seinen 140 Aminosäuren und ca. 14 kDa gut löslich. Im nativen Zustand liegt es als ungefaltetes Protein vor.

Die Synuclein-Protein-Familie besteht beim Menschen aus drei verschiedenen Genprodukten: das α -Synuclein auf dem Chromosom 4q21, das β -Synuclein auf dem Chromosom 5q35 und das γ -Synuclein, welches auf dem Chromosom 10q23 kodiert ist (Jakes et al. 1994; Spillantini et al. 1995; Polymeropoulos et al. 1997; Lavedan et al. 1998). Das retinaspezifische Synoretin gilt als ein entferntes Mitglied der Synuclein-Protein-Familie (Surguchov et al. 1999). α -, β - und γ -Synucleine ähneln sich in der Größe, bestehen aus ca. 127 bis 140 Aminosäuren und

besitzen eine 55-62 %ige Aminosäuresequenzhomologie (Lavedan 1998; Goedert 2001).

Im Jahre 1988 konnte α -Synuclein erstmals aus präsynaptischen Nervenendigungen des elektrischen Organs von kalifornischen Zitterrochen (*Torpedo californica*) isoliert werden. Nach seiner Lokalisation in Nervenendigungen sowie im *Nucleus* und der vermuteten Funktion an cholinergen synaptischen Vesikeln (Maroteaux et al. 1988) wurde dieses Protein Synuclein genannt. Im Gegensatz zur zytoplasmatischen Lokalisation in den Synapsen konnte in nachfolgenden Studien das nukleäre Vorkommen des α -Synucleins nicht mehr bestätigt werden, dennoch blieb der Name bestehen (Jakes et al. 1994; Masliah et al. 1997; Goedert 2001).

Die Verbindung von α -Synuclein mit neurodegenerativen Erkrankungen wurde von Ueda *et al.* gezeigt, als dieser bei Alzheimer-Patienten ein Peptid bestehend aus 35 Aminosäuren entdeckte, das keine Gemeinsamkeit mit β -Amyloid zeigte und daraufhin als Nicht-Amyloid-Beta-Komponente (engl. *non-amyloid beta component of AD amyloid plaques*, NAC Peptid) benannt wurde (Ueda et al. 1993). Dessen Vorläufer-Protein wurde dementsprechend Nicht-Amyloid-Beta-Komponente-Vorläufer genannt (engl. *non-amyloid beta component precursor*, NACP). In Antikörperstudien gegen gepaarte helikale Filamente aus Gehirnen von Alzheimer-Patienten konnten sowohl das NACP-Mutterprotein als auch α -Synuclein identifiziert werden (Jakes et al. 1994). γ -Synuclein wurde von Ji (Ji et al. 1997) als ein übermäßig stark exprimiertes Protein im Brustkrebsgewebe gefunden und zunächst Brustkrebs-spezifisches Gen 1 genannt (engl. *breast cancer specific gene 1*, BCSG1) (Ji et al. 1997). Nachdem Strukturanalysen die große Homologie von α - und β -Synuclein aufdeckten, wurde das Protein in γ -Synuclein umbenannt (Lavedan 1998; Goedert 2001). Alle Mitglieder der Synucleinfamilie (α -, β -, γ -Synuclein) werden in hohem Maße im ZNS exprimiert und nur in geringerem Maße in anderen Organen wie Pankreas, Niere, Lunge oder Skelettmuskel (Nakajo et al. 1994; Iwai et al. 1995; Lavedan et al. 1998; Högen 2009). Die Schlüsselposition des α -Synucleins als zentrales aggregiertes Protein in neuronalen und glialen Einschlusskörperchen (LK, LN) (vgl. Kapitel 1.2.) führte zu vermehrten Untersuchungen an dem Protein bzw. der Proteinfamilie.

1.3.2 Proteinstruktur

α -Synuclein ist ein zytoplasmatisches Protein, das jedoch eine Koloalisation mit synaptischen Membranen bzw. mit synaptischen Vesikeln aufweist (Irizarry et al. 1998; Kahle et al. 2000). Es sind drei humane Isoformen bekannt, zu denen zwei kurze Varianten, das α -Synuclein-126 (Deletion Exon 3, AS 41-54) und das α -Synuclein-112 (Deletion Exon 5,

AS 103-130) zählen. Das Volllängenprodukt α -Synuclein-140 ist die dritte und bekannteste Isoform (Beyer 2006) und lässt sich in drei Abschnitte gliedern; die N-terminale Region, die zentrale Region und die C-terminale Region.

Die N-terminale Region (AS 1-60) ist durch vier unvollständige Wiederholungssequenzen (je 11 AS lang) mit dem hexamerischen Konsensusmotiv KTKEGV charakterisiert. Dieses Motiv befindet sich sowohl im Übergang von der N-terminalen Region zur NAC-Region sowie ein weiteres Mal in der NAC-Domäne selbst (AS 61-95). In Gegenwart von negativ geladenen Lipid-Wasser-Grenzflächen bilden sich aus einer ungeordneten Sekundärstruktur zwei amphipatische α -Helices, ähnlich den Lipidbindungsdomänen von Apolipoproteinen (Davidson et al. 1998). In der N-terminalen Domäne des α -Synuclein-Gens finden sich die Punktmutationen A30P, A53T und E46K, die mit einer hereditären Form des Morbus Parkinson assoziiert sind (Polymeropoulos et al. 1997; Kruger et al. 1998; Zarranz et al. 2004).

Die zentrale Region (AS 61-95) besitzt eine hydrophobe Aminosäure und wird als die *nicht Amyloid-beta*-Komponente (NAC) in Alzheimer-Plaques beschrieben (Ueda et al. 1993; Takeda et al. 1998). Die NAC-Domänensequenz weist einen hoch-amyloidogenen, β -faltblattfördernden Anteil auf, der in Aggregationsversuchen keine Tendenz zur Selbstaggregation *in vitro* zeigt. Hierin unterscheidet sich α -Synuclein von dem β -Synuclein, dem 11 Aminosäuren innerhalb der NAC-Sequenz (AS 73-83) fehlen (Kahle et al. 2002). Auch γ -Synuclein weist im zentralen Domänenbereich eine veränderte Aminosäuresequenz auf und besitzt eine geringe Bildungswahrscheinlichkeit für amyloidartige, fibrilläre Ablagerungen (Serpell et al. 2000; Uversky et al. 2002). Es wird vermutet, dass die Aggregationseigenschaft des α -Synucleins durch die hydrophobe Peptidsequenz (AS 72-83) der zentralen NAC-Domäne bedingt ist. Die NAC-Domänensequenz kann allein und zusammen mit dem α -Synuclein-140 eine Fibrillenbildung induzieren. Bei Verlust der hydrophoben AS kann die Aggregationstendenz verloren gehen. Dies geschieht entweder durch einen mutationsbedingten Austausch der AS in hydrophile AS oder durch eine Deletion dieses Abschnitts (Giasson et al. 2001). Ein Aminosäuresequenzvergleich der α -Synuclein NAC-Domäne mit amyloidogenen Proteinen anderer neurodegenerativer Erkrankungen zeigt, dass die Sequenz „VGGAVVTG“ (AS 66-73) bei α -Synuclein ähnlich den Sequenzen „VGGVVIAT“ (AS 36-42) in A β () bzw. „AAGAVVGG“ (AS 117-124) im Prionprotein ist und damit eine Art Konsensussequenz besitzt (Tofaris and Spillantini 2005).

Die C-terminale Region (AS 96-140) ist bei physiologischem pH negativ geladen. An den Positionen 125, 133, 136 befindet sich die AS Tyrosin und an der Position 129 die AS Serin.

Diese Positionen gelten als potentielle aggregationsbeeinflussende Phosphorylierungs- und Nitrierungsstellen (Okochi et al. 2000; Pronin et al. 2000; Uversky et al. 2001; Kahle et al. 2002; Högen 2009). Die Rolle der C-terminalen Region im Aggregationsverhalten des α -Synucleins wird unterschiedlich diskutiert. Einerseits gibt es Hinweise, dass C-terminal trunkiertes α -Synuclein eine deutlich stärkere Aggregationsneigung besitzt (McLean and Hyman 2002), andererseits zeigten Studien, dass der negativ geladene C-Terminus insbesondere bei metallionenabhängigen Aggregationsprozessen involviert ist (Ostrerova-Golts et al. 2000; Uversky et al. 2001).

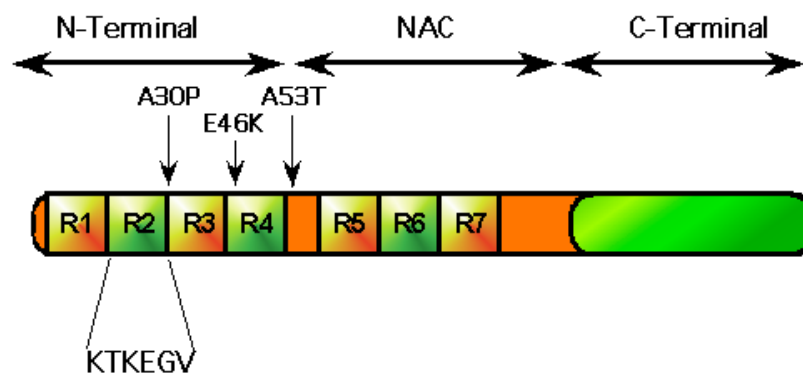


Abb. 3: Schematische Darstellung der humanen α -Synuclein-Domänen

α -Synuclein-Aminosäuresequenz mit farbigen Regionen (1-7). Die Pfeile weisen auf Aminosäureaustausche bei familiären Parkinson-Fällen hin. NAC bezeichnet die non-A β Komponente, N-Terminus das Aminoterminal Ende und C-Terminus steht für das Carboxyterminale Ende des α -Synuclein. KTKGV ist eine Konsensussequenz, welche Bestandteil sich wiederholender Domänen der Synuclein-Familie ist.

1.3.3 Physiologische Funktion von α -Synuclein

Die physiologische Funktion des α -Synucleins ist nicht abschließend geklärt. Gegenwärtig ist sowohl eine Beteiligung am Kreislauf als auch am Transport synaptischer Vesikel bekannt. Weiterhin kann eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit Membranen und Lipiden sowie eine Beteiligung bei der Wechselwirkung von zytosolischen und membrangebundenen Proteinen genannt werden.

In präsynaptischen Nervenendigungen liegen α -Synuclein-Monomere sowohl als freie als auch in einer vesikel- bzw. plasmamembrangebundenen Form vor. Ca. 15 % des α -Synucleins sind membrangebunden (McLean et al. 2000; Lee et al. 2002). Diese Lokalisation lässt vermuten, dass α -Synuclein die Bildung und Speicherung sowie den Umsatz und die Transmitterfreisetzung synaptischer Vesikel reguliert (Davidson et al. 1998; Clayton and George 1999; Liu et al. 2004; Yavich et al. 2004). In der Tat konnte gezeigt

werden, dass eine α -Synuclein-Überexpression die Anlagerungs- und Verschmelzungsschritte der präsynaptischen Vesikel mit der Plasmamembran behindert (Larsen et al. 2006). Mäuse, die kein α -Synuclein exprimieren, zeigten eine gesteigerte Freisetzung von Dopamin, wenn *striatale* Neurone elektrisch gereizt wurden. Dies deutet auf eine aktivitätsabhängige, negativ-regulatorische Funktion des α -Synucleins innerhalb der *striatalen* Neurotransmission hin (Abeliovich et al. 2000). Zudem ist α -Synuclein in der Lage, an präsynaptische Dopamintransporter zu binden und die Dopaminaufnahme durch eine Translokation des Transporters an die Zelloberfläche zu fördern (Lee et al. 2001; Högen 2009).

Das α -Synuclein beeinflusst aber nicht nur die synaptische Funktion, sondern möglicherweise auch die (synaptische) Membranorganisation. Es zeigen sich sowohl bei einer Überexpression in neuronalen Zellen als auch bei der homozygoten Deletion von α -Synuclein *in vivo* Veränderungen in der Membranfluidität, der zellulären Fettsäureaufnahme sowie des Fettsäuremetabolismus (Uversky 2007). Monomeres α -Synuclein interagiert in einem stabilen System unter Ausbildung einer N-terminalen α -helikalen Sekundärstruktur mit verschiedenen Phospholipidmembranen mit negativ geladenen Phospholipidvesikeln (Palmitoyl-Oleoyl-Phosphatidylserin, POPS) sowie mit Fettsäuren und mit zellulären Membranen (Beyer 2007; Uversky 2007). Daher wird vermutet, dass α -Synuclein die Stabilisierung von Membranen und die Regulierung des Vesikelpools unterstützt (Nuscher et al. 2004; Kamp and Beyer 2006; Beyer 2007). Zellorganellen wie Mitochondrien oder das endoplasmatische Retikulum verfügen über biologische Membranen, die aus ca. 40% zwitterionischen PC-Lipidstrukturen (Phosphatidylcholin) bestehen und daher potentiell mit α -Synuclein-Aggregaten interagieren können (Dowhan 2009). α -Synuclein, aber auch sein Homolog β -Synuclein werden als hoch affine Inhibitoren der Phospholipase D2 (PLD2) beschrieben. Die PLD2 ist nahe der Plasmamembran lokalisiert und hydrolysiert Phosphatidylcholin zu den sekundären Botenstoffen Phosphatidylsäure und Cholin. Diese greifen sowohl in die signalinduzierten, zytoskelettalen Regulationsmechanismen als auch in Endozytosevorgänge ein (Jenco et al. 1998; Goedert 2001). Hierbei wird auch durch die Phosphorylierung von α -Synuclein ein weiterer Mechanismus ausgelöst. Durch verschiedene Kinasen, wie die Casein Kinase I oder die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen wird α -Synuclein an Serin-129 phosphoryliert. Dadurch vermindert sich die Fähigkeit des α -Synuclein, mit Phospholipiden und Lipasen zu interagieren (Okochi et al. 2000; Pronin et al. 2000; Högen 2009). Dies deutet auf einen regulativen Effekt von α -Synuclein bei der Biosynthese von synaptischen Membranen und auf den synaptischen Vesikelkreislauf hin. α -Synuclein weist eine 40-prozentige Übereinstimmung in der N-terminalen Aminosäuresequenz mit dem Chaperone 14-3-3 auf,

was vermuten lässt, dass α -Synuclein auch eine Chaperonefunktion besitzen könnte. Das zytosolische 14-3-3 Protein hemmt die Apoptose von Nervenzellen über die Antagonisierung von BAD (engl. *Bcl-2-associated death promoter*), einem proapoptotischen Mitglied der BCL2-Familie. Für α -Synuclein wird hingegen eine toxische Wirkung diskutiert, die durch die Ausbildung eines Proteinkomplexes mit dem antiapoptotischen Faktor 14-3-3 induziert wird (Recchia et al. 2004).

α -Synuclein gilt auch als Hilfs-Chaperone, das die Nervenendigungen bei Schädigung im Cystein-Strang-Protein (CSP α)-SNARE-Signalweg zu schützen vermag. So ist der Neuronenverlust und die Letalität der CSP α -defizienten Mäuse durch eine Überexpression von α -Synuclein deutlich geringer. Es ist davon auszugehen, dass α -Synuclein nicht die Funktion des CSP α übernimmt, sondern als *Downstream* in der Regulation und im Zusammenbau des SNARE-Komplexes eingreift, welcher für die Vesikelfreisetzung essentiell ist (Chandra et al. 2005). Derzeit ist eine inhibierende Interaktion von α -Synuclein mit der c-jun N-terminalen Kinase, einem Protein der Mitogen-aktivierten Proteinkinasefamilie, beschrieben (Hashimoto and Masliah 1999). Bisher jedoch sind der Stellenwert und die funktionelle Konsequenz aller Interaktionen von α -Synuclein *in vivo* noch nicht abschließend geklärt.

1.3.4 Aggregationsverhalten und Pathophysiologie

Der Entstehungsprozess von amyloidartigen Aggregaten bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen beginnt mit nativen Monomeren, die sich zu Oligomeren verschiedener Größe zusammenlagern und schließlich als fibrilläre Aggregate in Lewy-Körperchen vorliegen (Conway et al. 2000; Goldberg and Lansbury 2000; Volles et al. 2001; Sanchez et al. 2003; Fink 2006; Kaye et al. 2007). Als pathologische Ursache der Neurodegeneration beim Morbus Parkinson wird vermutet, dass kleine α -Synuclein-Oligomere die wesentliche toxische Spezies darstellen und nicht Fibrillen (Haass and Selkoe 2007; Kaye et al. 2007). Folgt man dieser Hypothese, sind die großen intrazellulären Proteinablagerungen, wie z.B. die LK oder LN, eher als ein Schutzmechanismus zu verstehen, der eine Zellschädigung unterbinden soll. Man nimmt jedoch auch an, dass sich aus den fibrillären Aggregaten kleine Fragmente, also Oligomere lösen können. Diese induzieren entweder toxische Effekte oder dienen als Aggregationskeime, an denen sich durch Monomeranlagerung neue Aggregate bilden können. Dies wird im Englischen als *seeding* bezeichnet (Wood et al. 1999; Haass and Selkoe 2007; Högen 2009). Untersuchungen an Zellen, die humanes α -Synuclein überexprimieren, zeigen eine höhere Apoptoserate sowie

eine Zellorganellschädigung. Die genannten Effekte sind unabhängig von detektierbaren, fibrillären Proteinablagerungen, können aber durch oxidativen Stress erhöht werden (Gosavi et al. 2002).

Bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie MP, MA und CJD gibt es Hinweise auf einen ähnlichen pathologischen Mechanismus der Aggregation (Bucciantini et al. 2002; Kayed et al. 2004). Als die beiden wahrscheinlichsten Mechanismen gelten die Einlagerung toxischer Oligomere in Lipidmembranen (Volles et al. 2001; Volles and Lansbury 2002; Kayed et al. 2004) und eine Störung des Proteasomsystems. So wird vermutet, dass eine Einlagerung von Oligomeren in Zellmembranen, Zellorganellmembranen oder Vesikeln zur Permeabilisierung und damit zu Störungen in der Ionenverteilung führt. Auf der anderen Seite kann eine hemmende Wirkung im Proteinabbau zur Akkumulation verschiedener Proteine führen (Tanaka et al. 2001; Lindersson et al. 2004). Es wird angenommen, dass bei der Aggregation von Protein-Monomeren zu Amyloidfibrillen intermediäre, globuläre Oligomerspezies oder Protofibrillen eine Zwischenstufe bilden (Fink 2006; Kayed et al. 2007; Uversky 2007; Glabe 2008). Für α -Synuclein konnte gezeigt werden, dass sie ringförmige bzw. porenähnliche Strukturen ausbilden (Sharon et al. 2003; Pountney et al. 2004; El-Agnaf et al. 2006).

In epidemiologischen Studien konnte gezeigt werden, dass Schwermetallionen wie Eisen bei der Ätiologie des Morbus Parkinson beteiligt sind (Zayed et al. 1990; Gorell et al. 1997). Desweiteren zeigten die beim MP betroffenen Hirnregionen des Hirnstamms, wie die *Substantia nigra* und der *Locus coeruleus*, eine hohe Eisenkonzentration. Beide Hirnregionen zeichneten sich durch besonders viel Neuromelanin aus, das reaktive Metallionen vor allem Eisenionen, bindet und sequestriert. Parkinson-Patienten zeigten bei einem erhöhten Eisenspiegel in dopaminergen Neuronen in der *Substantia nigra* eine schwerere neuropathologische Veränderung (Gotz et al. 2004) und in *post mortem* Studien in LK einen signifikant erhöhten dreiwertigen Eisenionen-Spiegel (Fe^{3+}) im Vergleich zu zweiwertigen Fe^{2+} -Ionen (Gaeta and Hider 2005). Durch bildgebende Verfahren wie dem *transcraniellen* Ultraschall oder der Magnetresonanztomographie können frühzeitig Veränderungen im Eisenmetabolismus und eine damit assoziierte gesteigerten Eisenablagerung detektiert werden.

Es besteht die Vermutung, dass dies eine Vorstufe zur Degeneration der dopaminergen Neurone ist und damit möglicherweise ein frühes Stadium des Morbus Parkinson darstellt (Berg 2007; Michaeli et al. 2007; Oakley et al. 2007; Tofaris et al. 2007). In der *Substantia nigra* werden ca. 10-20 % des gesamten zerebralen Eisenpools gespeichert. Hier sammelt sich vom Kleinkindalter bis hin zum 40. Lebensjahr Eisen von 20 ng/mg auf über 200 ng/mg an.

Danach bleibt das Niveau stabil (Gaeta and Hider 2005). Bei Parkinson-Patienten ist die Eisenkonzentration in der *Substantia Nigra pars compacta* um bis zu 30-35 % erhöht. In einem Tiermodellsystem konnte eine neuroprotektive Wirkung von Eisenchelatoren in der *Substantia nigra* gezeigt werden, welche durch einen Neuronenverlust und durch eine Proteasomeninhibition als auch durch MPTP- bzw. 6-Hydroxydopamin-Behandlung inhibiert werden kann (Shachar et al. 2004; Zhang et al. 2005; Kaur et al. 2007). In *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass extrazellulär bzw. intrazellulär lokalisiertes Eisen die Bildung von α -Synuclein-Oligomeren sowie Amyloidfibrillen triggert (Ostrerova et al. 1999; Uversky et al. 2002; Hasegawa et al. 2004). Es gibt also viele Hinweise dafür, dass Eisenionen in der Pathogenese des Morbus Parkinson eine zentrale Rolle spielen.

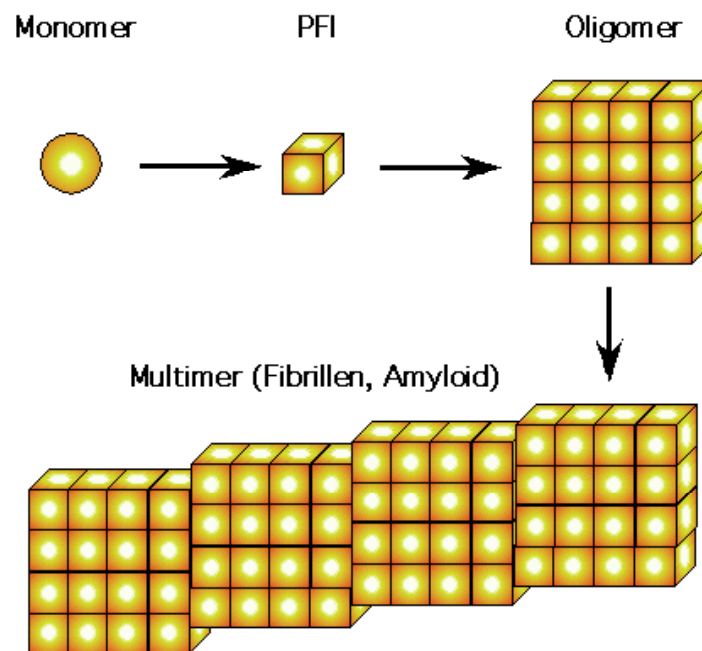


Abb. 4: Aggregationsverhalten von Proteinen

Neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson zeichnen sich durch die Bildung und Ablagerung verschiedener pathologischer Aggregatspezies aus. Aus dem Monomer bilden sich oligomere Zwischenstufen wie das partiell gefalteten Molekülen (engl. *partially folded intermediat*, PFI), welches als die wesentliche toxische Spezies angenommen wird.

1.4 Elektrophysiologische Grundlagen

1.4.1 Neurotransmitter Glutamat und Glutamat-Rezeptoren

Die Aminosäure L-Glutaminsäure (Abb. 5) ist die einzige Aminosäure, welche im Gehirn oxidiert, transaminiert, aminiert und decarboxyliert wird. In den meisten physiologischen

Beschreibungen wird sie Glutamat genannt, da die Verbindung im Körper dissoziiert vorliegt. L-Glutamat wird als der essenziellste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Säugetiernervensystem angesehen. Es ist an nahezu allen physiologischen Abläufen wie Kognition, Schmerzverarbeitung, Motorik, Gedächtnis und Lernen beteiligt (Danbolt 2001). Glutamat interagiert mit sogenannten Glutamat-Rezeptoren, welche sich in zwei Gruppen unterteilen lassen: Ionotrope Glutamat-Rezeptoren und die metabotropen Glutamat-Rezeptoren (mGluRs). Ionotrope Glutamat-Rezeptoren sind membranständig und an Ionenkanalproteine gekoppelt. Die Bindung von Glutamat an ionotrope Rezeptoren induziert eine Ionen-Permeabilisierung und darauf folgend eine Veränderung des postsynaptischen Membranpotentials (Seeburg 1993). Die metabotropen Glutamat-Rezeptoren sind prä- und postsynaptisch in der Membran lokalisiert. Sie sind in die Signalkaskade zwischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Zellmembran und den Second Messengers geschaltet. Nach einer Ligandenbindung über G-Proteine und die darauf folgende Signalkaskade vermittelt einen modulatorischen Effekt auf die neuronale Signalverarbeitung (Morhagen 2000; Kew et al. 2002).

Seit Hollmann den ersten funktionellen Glutamat-Rezeptor (GluR1, AMPA Rezeptor) entdeckte (Hollmann et al. 1998), wurden über Sequenzanalogien weitere ionotrope und metabotrope Glutamat-Rezeptoren gefunden. Glutamat wirkt nicht nur als Neurotransmitter, sondern hat in hohen Konzentrationen einen neurotoxischen Effekt. Dies zeigt sich z.B. bei epileptischen Anfällen (Babb et al. 1998), Schizophrenie (Catts et al. 1997), Hypoxie und Ischämie (Budd 1998; Vandenberg 1998). Diese Neurotoxizität von Glutamat ist im Wesentlichen durch einen übermäßigen Ca^{2+} -Einstrom bedingt (Choi et al. 1988).

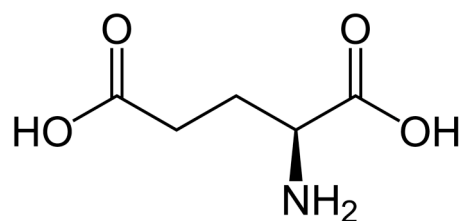


Abb. 5: L-Glutaminsäure

1.4.1.1 Metabotrope Rezeptoren

Metabotrope Rezeptoren verändern über G-Proteine intrazelluläre Stoffwechselvorgänge wie z.B. den intrazellulären Ca^{2+} -Haushalt. Hierbei wird über ein G-Protein das Enzym Phospholipase C (PLC) aktiviert und die Spaltung des Membranlipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in die beiden sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5,-triphosphat (IP3)

und Diacylglycerin (DAG) initiiert. DAG kann in der Gegenwart von Ca^{2+} -Ionen und Lipiden die Sensitivität der Proteinkinase C (PKC) gegenüber Ca^{2+} erhöhen. Dieser Komplex von PKC mit DAG sowie Ca^{2+} und Lipiden ist in der Lage, Proteine zu phosphorylieren.

IP_3 ist wasserlöslich und fungiert als sekundärer Botenstoff (engl. *second messenger*), der in das Zytoplasma diffundiert und an den ER-membranständigen IP_3 -Rezeptor bindet. Damit bewirkt er die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem internen (IP_3 -sensitiven) Speicher. Anschließend wird IP_3 entweder zu freiem myo-Inositol dephosphoryliert oder durch eine spezifische Ca^{2+} -aktivierte Kinase zu Inositol-1,3,4,5-tetraphosphat (IP_4) weiterphosphoryliert, während DAG schnell abgebaut wird. Die Membranleitfähigkeit für Ionen und damit auch das Membranpotential werden durch die Aktivierung der ionotropen Glutamat-Rezeptoren geändert.

1.4.1.2 Ionotrope Glutamat-Rezeptoren

Die ionotropen Rezeptoren werden in zwei Hauptklassen unterteilt: die N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)- und non-NMDA-Rezeptoren. Mit Hilfe ihrer synthetischen Agonisten werden sie zusätzlich in die drei Gruppen NMDA-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren eingeteilt.

1.4.1.2.1 NMDA-Rezeptoren

Der NMDA-Rezeptor ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal, dessen Öffnungswahrscheinlichkeit vom Membranpotential abhängig ist (Hollmann et al. 1998). Er besteht aus fünf Untereinheiten und erlaubt den Durchfluss von ein- und zweiwertigen Ionen, also auch von Ca^{2+} (siehe Abb. 8). Die Ionenpermeabilität und deren Regulation durch Ca^{2+} werden durch die Untereinheitenzusammensetzung beeinflusst. (Koltchine et al. 1996; Morhagen 2000). Die Zusammensetzung der NMDA-Rezeptoruntereinheiten in jungen Tieren, also bei hoher synaptischer Plastizität, ermöglicht eine hohe Ca^{2+} -Permeabilität (Constantine-Paton 1994), die mit zunehmendem Alter und der Veränderung der Untereinheitenzusammensetzung abnimmt.

Da zur NMDA-Rezeptoraktivierung gleichzeitig Glutamat und Glycin als Agonisten vorhanden sein müssen (Kleckner and Dingledine 1988), sind diese Rezeptoren einzigartig unter allen Neurotransmitter-Rezeptoren. Der Kanal wird durch Magnesiumionen, die bei der Depolarisation aus der Zelle austreten, blockiert und es bedarf einer Vordepolarisation, damit das blockierende Magnesiumion abdiffundieren kann und damit der Kanal für Ca^{2+} -Ionen permeabel ist. Daher ist der NMDA-Rezeptor ein sogenannter Koinzidenzdetektor. Einstömende Na^+ -Ionen führen zu einer Membrandepolarisierung, während einströmende

Ca^{2+} -Ionen als sekundäre Botenstoffe über Proteinkinasen und Phosphatasen die Proteinaktivitäten regulieren und die Genexpression modulieren (Kornhuber and Weller 1997). Dies hat eine Veränderung der synaptischen Eigenschaften im Bereich von Stunden bis Tagen zufolge, was als Langzeit-Potenzierung und Langzeit-Depression bezeichnet wird. LTP und LTD gelten als die grundlegenden Mechanismen des Lernens und des Gedächtnisses (Petrovic et al. 2005). NMDA-Rezeptoren sind für die Ca^{2+} -vermittelte Zytotoxizität von entscheidender Bedeutung (siehe Kapitel 1.4.1.3).

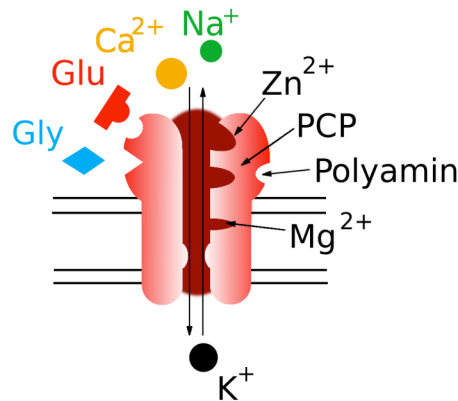


Abb. 6: Permeabilität des NMDA-Rezeptors

Der NMDA-Rezeptor ist ein unspezifischer Kationenkanal, der permeabel für Kalzium (Ca^{2+}), Natrium (Na^{+}) und Kalium (K^{+}) ist und Bindungsstellen für Glycin (Gly), Zink (Zn^{2+}), Phencyclidin (PCP) und Magnesium (Mg^{2+}) aufweist. Diese regulieren die Funktion des Kanals (Kandel et al. 1991).

1.4.1.2.2 Non-NMDA-Rezeptoren

Zu den non-NMDA-Rezeptoren gehören die α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat (AMPA)- und die Kainat-Rezeptoren. AMPA-Rezeptoren besitzen die Untereinheiten GluR1-4 und bilden daraus Homo- oder Heteromere (Hume et al. 1991; Verdoorn et al. 1991; Burnashev et al. 1992).

Die GluR1-4- Untereinheiten können jeweils zwei Formen ausbilden, die über alternatives Spleißen gebildet werden (Sommer et al. 1990). Die sogenannten *flip* und *flop* Varianten der Untereinheiten werden im Laufe der Entwicklung in verschiedenem Maße exprimiert (Monyer et al. 1991). Alle Formen induzieren eine schnelle Neurotransmission und ermöglichen den Durchfluss monovalenter Ionen wie Na^{+} und K^{+} . AMPA-Rezeptoren können je nach Zusammensetzung der Untereinheiten der Kanäle auch Ca^{2+} -permeabel sein. AMPA-Rezeptoren ohne die GluR2-Untereinheit sind zusätzlich auch für Ca^{2+} durchlässig (Pellegrini-Giampietro et al. 1997).

Die Kainat-Rezeptoren bestehen aus den Untereinheiten GluR5-7 und KA1-2 (Herb et al. 1992; Swanson et al. 1996). Deren nicht desensitivierender Antagonist ist Kainat. Die

Funktion kann durch die differenzielle Expression der GluR2- und GluR4-Untereinheiten beeinflusst werden und wird in der unterschiedlichen Ca^{2+} -Permeabilität und in der Desensitivierungsgeschwindigkeit vermutet (Geiger et al. 1995). Kanäle mit der GluR2-Untereinheit weisen ein langsames Zeitverhalten mit Zeitkonstanten von 10-15 ms sowie eine geringe Ca^{2+} -Permeabilität auf (Mayer and Westbrook 1987; Hestrin 1993). Kanäle mit der GluR4-Untereinheit besitzen eine schnellere Zeitkonstante (3-6 ms) und eine hohe Ca^{2+} -Durchlässigkeit (Hestrin 1993; Koh et al. 1995).

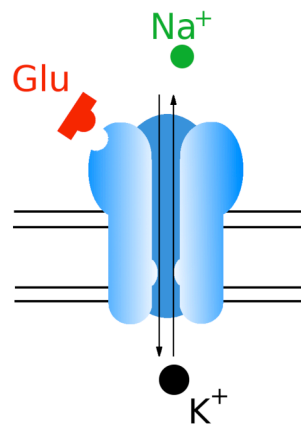


Abb. 7: Non-NMDA-Rezeptoren

Die Rezeptoren werden selektiv von den Antagonisten Kainat, AMPA und Quisqualat gehemmt und durch Glutamat (Glu) aktiviert. Der assoziierte Ionen-Kanal ist für Na^+ - und K^+ -Ionen stärker permeabel als für Ca^{2+} -Ionen (Kandel et al. 1991).

1.4.1.3 Glutamat-Rezeptoren und Zelltoxizität

Es ist gut bekannt, dass die Stimulierung von Glutamat-Rezeptoren und Zelltoxizitätsmechanismen in einem direkten Zusammenhang stehen. Dies ist allerdings im Rahmen von akuten ZNS-Schäden, wie Hypoxie und Ischämie, aber auch bei chronischen neurologischen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer beschrieben (Martin and Shapiro 2000). Bei anhaltender Hypoxie oder Ischämie werden die zellulären Energiereserven aufgebraucht, der energieabhängige Ca^{2+} -Auswärtstransport und die Speicherung von Ca^{2+} -Ionen im endoplasmatischen Retikulum sind gestört. Mitochondrien nehmen hierbei vermehrt Ca^{2+} -Ionen auf, ohne den durch die Ischämie hervorgerufenen Ca^{2+} -Einstrom zu kompensieren. Durch die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann eine Reaktionskette ausgelöst werden, welche die irreversible Schädigung des Neurons zur Folge hat. So kommt es z.B. zu einer vermehrten Freisetzung von exzitatorischen Transmittern wie Glutamat. Durch die Anreicherung von Glutamat im Extrazellulärraum werden die NMDA-Rezeptoren übermäßig aktiviert und damit kommt es zu einer sehr starken Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration im Zytoplasma. Dies begünstigt eine Aktivierung von Proteasen, Lipasen und

Endonukleasen und führt zu einer irreversiblen Schädigung der Zelle. Dieser Mechanismus wird Exzitotoxizität genannt (Dirnagl et al. 1999; Hungerhuber 2003).

1.4.2 Ca^{2+} -Ionen als zelluläre Botenstoffe

Ca^{2+} -Signale sind streng definierte Änderungen lokaler Ca^{2+} -Ionenkonzentrationen, die zur Aktivierung zellulärer Prozesse führen (Bootman et al. 2001), wie die Skelettmuskel- und Herzmuskelkontraktion, Blutgerinnung, Sekretion, Endo-, Exo- und Phagozytose und die Zellbewegung. Auch andere neurophysiologische Prozesse wie die Zellteilung, die Differenzierung, der Zelltod, die Genexpression, die Enzymaktivierung und auch die Neurotransmitterfreisetzung können beeinflusst werden (Hungerhuber 2003; Carafoli 2005). Diese vielfältigen Wirkungsweisen werden über eine strikte Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration kontrolliert. Ca^{2+} liegt im Zytosol in einer sehr geringen Konzentration von 100 nM vor und ist damit um den Faktor 10.000 niedriger als im Extrazellulärraum. Mittels Pumpen werden Ca^{2+} -Ionen in die intrazellulären Ca^{2+} -Depots transportiert, wie z.B. das glatte endoplasmatische Retikulum (ER), so dass auch hier eine hohe Konzentration vorherrscht. Extrazelluläre Reize können die zytosolische Ca^{2+} -Ionenkonzentration zeitweise um das 10-100-fache erhöhen (Carafoli 2005). Die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration einer Nervenzelle wird über Aktionspotentiale und andere depolarisierende Stimuli gesteuert. Hierbei wird ein Ca^{2+} -Einstrom durch membranständige spannungsabhängige Kanäle (engl. *Voltage Operated Channel*, VOC) induziert. Die postsynaptischen Ca^{2+} -Ströme werden hingegen durch die Aktivierung ligandengesteuerter Ionenkanäle (engl. *Receptor Operated Channel*, ROC) reguliert, wie z.B. den NMDA-Rezeptor oder durch einige Typen von AMPA-Rezeptoren (Blackstone and Sheng 2002). Die Ca^{2+} -Freisetzung aus intrazellulären Speichern wie dem ER kann diese Signale verstärken.

1.4.3 Synaptische Neurotransmission im Hippokampus

Der Hippokampus gehört zu den evolutionsbedingt ältesten Bestandteilen des Gehirns. Er wird beim Menschen im Temporallappen lokalisiert und ist eine zentrale Schaltstation des limbischen Systems. Die Hippokampus-Formation umfasst die Regionen *Gyrus dentatus*, die Hippokampusrinde, welche aus den Regionen des *Cornu ammonis* und dem *Subiculum* besteht. Die Hippokampusrinde gliedert sich in die Sektoren CA1, CA2 und CA3. Die Aufteilung wird anhand ihrer Neuronendichte und neuronalen Verschaltungen vorgenommen. Beim *Gyrus dentatus* unterscheidet man drei histologische Schichten: das relativ zellarme *Stratum moleculare*, das *Stratum granulosum*, das von dicht gepackten Körnerzellen gebildet

wird und die polymorphe Schicht im *Hilus*. Letztere weist einen hohen Anteil an terminalen und verschiedene Interneuronentypen auf (Baumgartner et al. 2004). Der Hippokampus ist durch verschiedene Faserbahnen mit anderen Hirnregionen über extrinsische Verbindungen verknüpft. Er erhält seine Afferenzen hauptsächlich über den *Tractus perforans* aus dem *entorhinalen Kortex*. Im *Gyrus dentatus* wird auf die Körnerzellen umgeschaltet, woraufhin deren Axone, die sogenannten Moosfasern, auf die Pyramidenzellen der CA3-Region projizieren. Diese ziehen ihrerseits über die sogenannten Schaffer-Kollateralen zu den großen CA1-Pyramidenzellen. Die Fortsätze der CA1-Zellen verlaufen über das *subiculum* zurück zum *entorhinalen Kortex*.

Der Hippokampus hat in Verbindung mit anderen Strukturen des limbischen Systems große Bedeutung für das Lern- und Gedächtnissystem. Er hat eine Schlüsselposition für das anterograde und das retrograde Gedächtnis innerhalb des Kurzzeitgedächtnisses (Scoville and Milner 1957). Bei Parkinson-Patienten werden intrazytoplasmatische Lewy-Körperchen (LB) und Lewy-Neuriten in den Bereichen der *subkorticalen Nuclei* und dem Hippokampus nachgewiesen (Jellinger 2002).

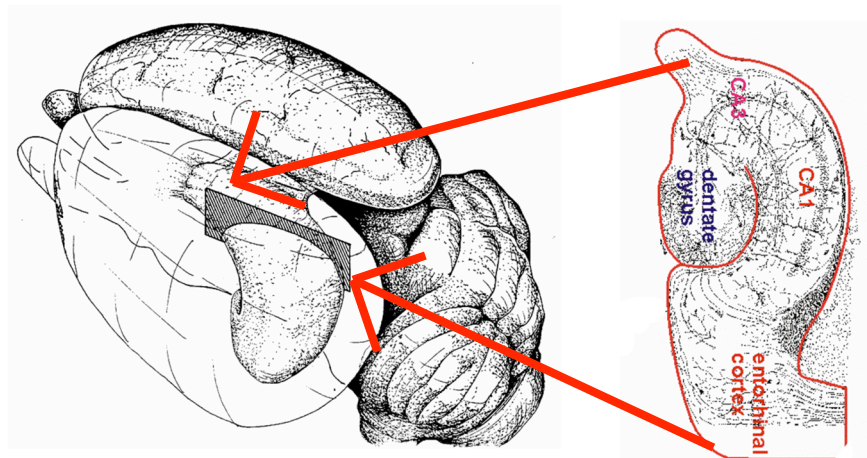


Abb. 8: Lokalisation des Hippokampus im Gehirn der Maus (Quelle)

Der Hippocampus umfasst die Regionen CA1 bis CA4 (von Cornu Ammonis), Eine tatsächliche anatomische und funktionale Bedeutung liegt nur in den CA1- und die CA3-Regionen vor.

1.4.4 Aufbau und Funktion der Synapse

Durch ein Aktionspotenzial (AP) öffnen sich Natrium- und Kaliumkanäle sowie vorübergehend spannungsaktivierte Ca^{2+} -Kanäle. Das hat einen kurzen Ca^{2+} -Einstrom zur Folge. Durch die intrazellulär erhöhte Kalzium-Konzentration verschmelzen die neurotransmitterhaltigen Vesikel mit der präsynaptischen Membran, auch Endozytose

genannt, und entleeren die Neurotransmitter in den synaptischen Spalt. Diese diffundieren zur postsynaptischen Membran und binden dort an bestimmte Rezeptoren, woraufhin die Na^+ -Ionenleitfähigkeit erhöht wird.

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im Gehirn und bindet an non-NMDA (AMPA/Kainat)- und NMDA-Rezeptoren der postsynaptischen Membran. Durch Aktivierung dieser Rezeptoren wird ein Kationen-Einstrom ausgelöst, der als exzitatorischer postsynaptischer Strom (engl. *Excitatory PostSynaptic Current*, EPSC) bezeichnet wird. Neurone weisen auch ohne AP-induzierte EPSCs eine Grundaktivität auf, die durch die spontane Freisetzung einer konstanten Transmittermenge aus einem mit der präsynaptischen Membran verschmelzenden Vesikel entsteht. Die resultierenden postsynaptischen Ströme bilden die Spontanaktivität und werden spontane EPSCs (sEPSC) genannt. Die Freisetzungswahrscheinlichkeit wird durch die präsynaptische Ca^{2+} -Konzentration beeinflusst (Borst and Sakmann 1996). Ohne AP-induzierte Stimulation ist die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sehr niedrig, so dass nur einzelne spontane Ereignisse detektiert werden. Durch ein AP erhöht sich die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ etwa um den Faktor 1000, wodurch es zur Freisetzung von zahlreichen Transmittervesikeln kommt. Diese führen postsynaptisch zur Auslösung eines wesentlich größeren EPSCs (Zucker and Regehr 2002).

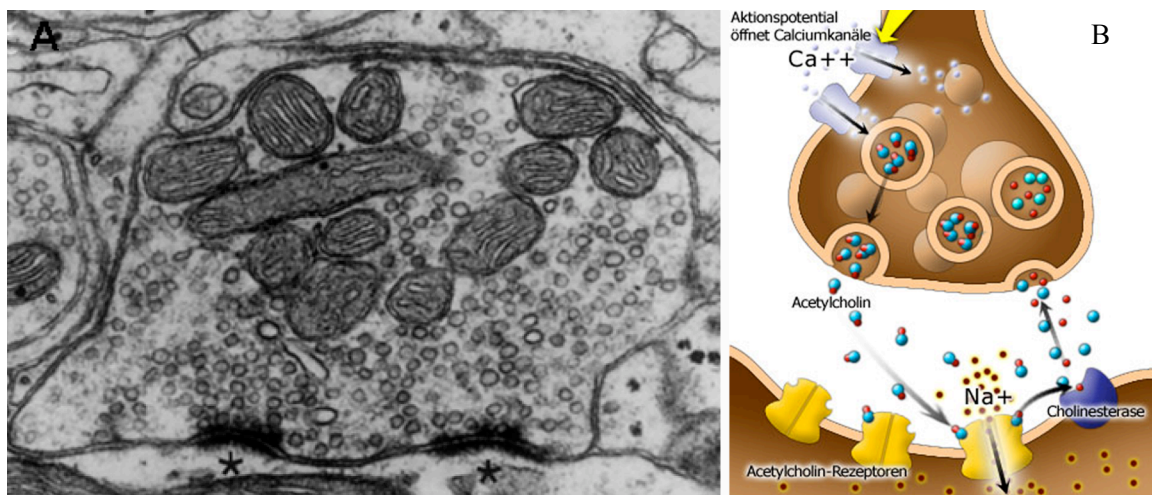


Abb. 9: Synapse

A Elektronenmikroskopisches Bild eines präsynaptischen Terminals. Die Sternchen kennzeichnen zwei aktive Zonen (adaptiert nach (Dresbach et al. 2001))

B Schema einer Synapse. Ein eintreffendes Aktionspotenzial führt zum Ca^{2+} -Einstrom und konsekutiv zu einer Transmitterfreisetzung aus synaptischen Vesikeln in den synaptischen Spalt. Diese diffundieren über den synaptischen Spalt hinweg und binden auf der postsynaptischen Seite an ligandengesteuerte Ionenkanäle.

1.4.5 Synaptische Plastizität

Das Gehirn des Menschen verändert seine Struktur und Funktion um Wahrnehmungen und Erfahrungen zu verarbeiten und zu speichern. Diese strukturellen und funktionellen Veränderungen können über drei Mechanismen erfolgen (modifiziert nach Malenka, Neuropsychopharmacology: The Fifth Generation of Progress, Chapter 11, 2002):

1. Funktionelle Veränderungen an Neuronen, z. B. Modifikation der Erregbarkeit
2. Auf- und Abbau synaptischer Verbindungen, Neurogenese
3. Änderungen der Effektivität synaptischer Übertragung an bereits existierenden Synapsen

Dieser letzte Punkt wird als synaptische Plastizität bezeichnet. Die Änderungen der Neurotransmission in der synaptischen Plastizität können transient (vorübergehend) oder persistierend (dauerhaft) sein. Die synaptische Plastizität wird unterteilt in Kurzzeitplastizität und Langzeitplastizität. Als Kurzzeitplastizität werden Änderungen der synaptischen Übertragung im Zeitraum einiger Millisekunden bis Sekunden bezeichnet. Langzeitplastizität hingegen bedeutet Minuten bis Tage dauernde Veränderungen (Martin and Shapiro 2000; Malenka and Bear 2004).

Die Erstbeschreibung von Langzeitplastizität erfolgte durch Bliss und Lomo (Bliss and Lomo 1973). Sie wird in der Langzeitpotenzierung (*LTP*) und der Langzeitdepression (*LTD*) unterschieden. Beiden Mechanismen muss eine Aktivierung ionotroper (Collingridge et al. 1983; Dudek and Bear 1992) oder metabotroper Glutamat-Rezeptoren (Bashir et al. 1993; Manahan-Vaughan and Reymann 1997) vorangehen. Bliss und Lomo stimulierten den *Tractus perforans* und erstellten eine Aufzeichnung der EPSP der Körnerzellen des *Dentatus Gyrus* (Bliss and Lomo 1973). Die hochfrequente Stimulation der Hippokampuseingänge bewirkte eine LTP, was zu einer Zunahme der Amplituden exzitatorischer postsynaptischer Potentiale (*EPSP*) führte.

Bei der Kurzzeitplastizität bewirkt eine vorausgehende synaptische Aktivierung eine synaptische Fazilitierung (Verstärkung) oder Depression (Verminderung) der synaptischen Übertragung zwischen Neuronen (Zucker and Regehr 2002). Treffen also zwei Aktionspotentiale in einem kurzen Intervall auf die präsynaptische Endigung, kann der zweite Reiz eine stärkere oder schwächere postsynaptische Reaktion auslösen. Im Falle der stärkeren Reaktion spricht man von Doppelpulsverstärkung (engl. *Paired Pulse Facilitation*, PPF), die auf einer residualen Anhebung der präsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration beruht. Beim ersten synaptischen Puls strömt $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in die Präsynapse und führt zur Transmitterfreisetzung. Ist die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ beim zweiten eintreffenden Puls durch residuales Ca^{2+} noch über der Ruhekonzentration, wird beim wiederholten Einstrom von Ca^{2+} die

Freisetzungswahrscheinlichkeit für die Neurotransmittervesikel erhöht. Daher werden beim zweiten Reiz mehr Vesikel entleert und der postsynaptische Strom ist verstärkt (Katz and Miledi 1968).

Eine Doppelpulserniedrigung (engl. *Paired Pulse Depression*, PPD) des zweiten Pulses dagegen wird auf einen erschöpften RRP zurückgeführt. Durch diesen stehen dem kurz darauffolgenden zweiten Impuls nicht mehr genügend Vesikel zur Verfügung und die Neurotransmitterfreisetzung ist zwangsläufig geringer. Das Resultat ist eine geringere postsynaptische Reaktion (Betz 1970). Die Feedback-Aktivierung präsynaptisch lokalisierter Rezeptoren wie GABAB-, Kainat- oder metabotrope Glutamat-Rezeptoren kann ebenfalls die Transmitterfreisetzung reduzieren (MacDermott et al. 1999; Schmitz et al. 2001). Auf postsynaptischer Seite kann darüber hinaus eine Rezeptordesensibilisierung zu Doppelpulsverminderung führen (Jones and Westbrook 1996). In hippokampalen Kulturen ist unter physiologischen Bedingungen die vorherrschende Form synaptischer Kurzzeitplastizität die PPD (Mennerick and Zorumski 1995).

1.4.6 Historische Betrachtung der *Patch-Clamp*-Technik

Die Ursprünge zur Untersuchung von Zellmembranen gehen auf den Arzt und Naturforscher Luigi Galvani (1727-1798) zurück, der das Vorhandensein einer „tierischen Elektrizität“ postulierte. Der erste elektrische Muskelstrom wurde von Carlo Matteucci (1811-1868) gemessen, während Emil du Bois-Reymonds (1818-1896) die wissenschaftliche Elektrophysiologie begründete. Julius Bernstein erkannte am Anfang des zwanzigsten Jahrhunderts in seiner „Membrantheorie der bioelektrischen Ströme“, dass an selektiv permeablen Zellmembranen die ungleiche Ionenverteilung für das Ruhepotential verantwortlich ist. Erst in den 1930er Jahren wurde von Kenneth S. Cole und H. J. Curtis die Technik der Spannungsklemme entwickelt, womit die Erhöhung der Membranleitfähigkeit einer Nervenzelle nach Erregung gezeigt werden konnte. Alan Hodgkin und Andrew Huxley konnten 1952 den zeitlichen Verlauf eines Aktionspotentials nachweisen, wofür ihnen 1963 der Nobel-Preis für Medizin und Physiologie verliehen wurde. Die ersten Einzelkanaluntersuchungen mit der *Patch-Clamp*-Technik wurden 1976 von den Wissenschaftlern Bert Sakmann und Erwin Neher an Froschmuskelzellen durchgeführt (Neher and Sakmann 1976). Sie verbesserten die Methode, so dass nun das starke, durch die Kanäle und Iontentransporter auf der Zelloberfläche verursachte Hintergrundrauschen minimiert werden konnte. Dies wurde mittels eines *Gigaseals* (engl. *to seal* – versiegeln) erreicht, bei dem der Abdichtwiderstand zwischen Pipette und Zellmembran durch einen

elektrischen Widerstand in der Größenordnung von bis zu 100 Gigaohm erreicht werden. Damit konnten Manipulationen an der Zelle vorgenommen werden, ohne dass die Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran abbriss. Neher und Sakmann gelang es erstmalig, einzelne Kanäle direkt zu beobachten. Auch sie wurden dafür 1991 mit dem Nobel-Preis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet. Heutzutage ist die *Patch-Clamp*-Technik eine etablierte und weltweit angewandte Methode zur Untersuchung von Membranströmen.

1.5 Konfokale Einzelmolekülspektroskopie

Die fluoreszenzbasierte Einzelmolekülspektroskopie zur Untersuchung chemischer Reaktionen und zur Messung von Diffusionsprozessen wurde vor fast 40 Jahren entwickelt (Magde et al. 1974; Aragon and Pecora 1975; Ehrenberg and Rigler 1976). Die Entwicklung eines konfokalen Aufbaus zur Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (engl. *Fluorescence Correlation Spectroscopy*, FCS) ermöglichte die Untersuchungen von Molekülen im femtomolaren Bereich anhand ihrer Fluoreszenzemission (Eigen and Rigler 1994; Schwille et al. 1997). Dies erfolgt durch Messung und Analyse der Signalfluktuations einer kleinen Molekülmzahl in einem definierten Fokussmessvolumen. Mittels eines konfokalen Mikroskops wird Licht eines Anregungslasers durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur fokussiert. Das Volumen des gemessenen Fokus entspricht ca. 10-15 Femtoliter (1 fl) bei einer Fokusabmessung von ca. $1 \mu\text{m}^3$. Die im Fokussvolumen befindlichen fluoreszenzmarkierten Moleküle werden angeregt und die emittierenden Photonen (Fluoreszenzemission) über das Objektiv gebündelt. Die Erfassung erfolgt konfokal über eine Lochblende (engl. *Pinhole*) mittels hochempfindlichem Einzelphotonendetektors. Zweifarbiges FCS-Analysen mit verschiedenen Laseranregungswellenlängen (Eigen and Rigler 1994; Schwille et al. 1997) ermöglichen die Untersuchung von Aggregations- bzw. Enzymkinetiken (Aragon and Pecora 1975; Winkler et al. 1999). Der Messbereich der FCS wird durch die Konzentration der messbaren Partikel in der Messlösung begrenzt. Es können Konzentrationen von nano- bis subpicomolar untersucht werden (Schwille et al. 1997). Die Partikelgröße korreliert mit der Diffusionszeit, so dass bei größeren Partikeln die Untersuchung der Diffusion bei einem stationären Fokus limitiert ist. Um dies zu vermeiden, wird ein konfokaler Messaufbau verwendet, bei dem die Helligkeitsfluktuation in konsekutiven Zeitsegmenten (engl. *bins*) mittels der Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungsanalyse (engl. *Fluorescence Intensity Distribution Analysis*, FIDA) verfolgt und ausgewertet wird. Für die Erfassung und Analyse großer seltener Partikel wird die Messprobe

mittels eines mobilen Fokus (engl. *Beamscanner*) mit einer Geschwindigkeit von 10 mm/s durchfahren. Dadurch vervielfacht sich das erfasste Volumen und somit die Zahl der Partikel, die im Fokus des Lasers erfasst werden. Hierbei können stark unterschiedliche Intensitäten von großen fluoreszierenden Molekülen hinsichtlich ihrer Konzentration und spezifischen Helligkeit dargestellt werden (Kask et al. 1999; Högen 2009).

Eine weitere Auswertungsmöglichkeit stellt die SIFT-Technik dar (engl. *scanning for intensely fluorescent targets*, Scannen nach hochintens fluoreszierenden Zielstrukturen). Hierbei wird über eine zeitaufgelöste Intensitätsanalyse der Fluoreszenzsignale bei aufeinanderfolgenden Zeitintervallen (engl. *Bins*) und der gleichzeitigen analytischen Abtrennung hoch intensiver Signale vom Hintergrundsignal das selektive Vorhandensein großer Aggregate untersucht (Giese et al. 2005; Högen 2009).

Da in Synucleopathien die Aggregation des α -Synucleins eine zentrale pathophysiologische Rolle spielt, bietet sich die konfokale Einzelmolekülspektroskopie mit FCS, FIDA und SIFT zur Untersuchung an. Die theoretischen Grundlagen und die technische Realisierung sind detailliert im Material- und Methodenteil erläutert (Material und Methoden 2.2.6).

1.6 Zielsetzung

Das idiopathische Parkinson-Syndrom ist die zweithäufigste Form der neurodegenerativen Erkrankungen. Parkinson ist morphologisch unter anderem durch die Ablagerung von α -Synuclein im Gehirn sowie durch einen vermehrten Zelluntergang und eine Abnahme der Synapsendichte charakterisiert. Insbesondere die Aggregation von α -Synuclein spielt in der Pathogenese des Morbus Parkinson und anderer Synucleinopathien eine zentrale Rolle. α -Synuclein ist ein synaptisches Protein, das an der Freisetzung von synaptischen Vesikeln und damit auch an der synaptischen Transmission beteiligt ist.

Hauptziel dieser Dissertation ist es deshalb, den Einfluss verschiedener oligomerer Formen von α -Synuclein auf die synaptische Transmission und deren möglichen toxischen Effekt auf Nervenzellen zu untersuchen.

Hierfür wird ein *in vitro*-Modell der α -Synuclein-Oligomerbildung etabliert, welches das Aggregationsverhalten von α -Synuclein bei Parkinson-Patienten widerspiegeln soll. Es werden verschiedene Präparationsprotokolle zur Herstellung von α -Synuclein-Oligomeren verwendet und mittels Einzelmolekülmessungen (FIDA-Analyse) charakterisiert.

Unter Verwendung von elektrophysiologischen Methoden soll schließlich die Frage geklärt werden, ob α -Synuclein-Oligomere die synaptische Transmission beeinflussen. Als Modell dienen autaptische hippocampale Primärzellkulturen von FVB-Mäusen. Besonderes Augenmerk liegt hierbei auf Veränderungen in der Amplitude stimulierter EPSCs, der Kurzzeitplastizität sowie den Pools an synaptischen Neurotransmitter-Vesikeln.

Außerdem soll geklärt werden, ob α -Synuclein-Oligomere das neuronale Ca^{2+} -Gleichgewicht stören und damit möglicherweise den Untergang von Neuronen induzieren können.

2 Material und Methoden

Der Material- und Methodenteil gliedert sich in vier Teile: Der erste Teil nennt die verwendeten Materialien und der zweite beschreibt die Präparation von α -Synuclein und dessen Oligomeren. Im dritten Abschnitt werden die Zellkulturverfahren, die Messungen der synaptischen Transmission und die Untersuchungen zur Zellvitalität dargestellt. Anschließend werden die Untersuchungsmethoden zum veränderten Ionenhaushalt gezeigt und der letzte Abschnitt befasst sich mit biochemischen Analysen.

2.1 Material

Allgemeine Verbrauchsmaterialien (Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen, Zellkulturplatten) wurden von den Firmen Eppendorf (Hamburg, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland), VWR (Ismaning, Deutschland) und Nunc (Wiesbaden, Deutschland) bezogen. Die mehrfach verwendeten Materialien wurden vor jeder Verwendung autoklaviert. Alle Chemikalien stammten von der Firma Sigma-Aldrich (München, Deutschland) und Zellkulturmedien wurden über Pan-Biotech (Aidenbach, Deutschland) bezogen. Gele und Puffer für die Western Blot-Analyse sowie die Zusätze für die primären Zellkulturen stammten von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland). Alle Chemikalien besaßen die höchste am Markt erhältliche Reinheit. Die Lösungen wurden mit Wasser aus einem Milli-Q Synthesis A10 System (Millipore, MA, USA) aufbereitet. Die verwendeten Mäuse gehörten dem FvB-Wildtyp-Stamm (Charles River, Deutschland) an.

2.2 α -Synuclein-Präparation und Aggregationsanalyse

Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Giese durchgeführt, welche dieses Verfahren am ZNP etabliert hatten. Um das Aggregationsverhalten des humanen α -Synuclein zu untersuchen, wird das Protein in *E. coli*-Zellen exprimiert und über verschiedene Protokolle aggregiert.

2.2.1 Proteinexpression

Für die Transformation von *E. coli* BL21(DE3) pLysS (Novagen, Madison, WI, USA) wurde das pET-5a/Synuclein wt-Plasmid (Prof. Phillip Kahle, Universität Tübingen) nach dem Protokoll von Nuscher et. al verwendet (Nuscher et al. 2004; Högen 2009). Nach 4-stündiger Inkubation der Bakterienkultur bei 37 °C wurde mittels Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranose

(IPTG, Promega, Mannheim, Deutschland) die Proteinexpression induziert. Die Zellen wurden durch Behandlung mit flüssigem Stickstoff gefroren und aufgetaut sowie durch anschließende Sonifikation lysiert. Das Lysat wurde 30 Minuten bei 90 °C inkubiert und 15 Minuten bei 17600 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0,22 µm Filter (Millex-GV, Millipore Corp., Bedford, MA, USA) aufgereinigt und mittels eines 25 mM - 500 mM Salzgradienten über einer Q-Sepharose Säule (HiTrap Q HP, 5 ml, Amersham Biosciences, München, Deutschland) eluiert. Zur Entfernung der Salzrückstände wurden alle α-Synuclein-Monomer-Fractionen durch eine Superdex 200 HR10/30 Gelfiltration (Amersham Biosciences, München, Deutschland) mit 20 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl (pH 8,0) als Laufpuffer gereinigt. Über Vivaspin-Säulen MWCO 5 kDa (Vivasciene, Stonehouse, UK) wurden die α-Synucleinfraktionen aufkonzentriert und mit Wasser äquilibriert. Mittels eines Bicichoninsäure-BCA-Protein-Quantifikationskits (Pierce, Rockford, IL, USA) wurde die Proteinkonzentration bestimmt, das α-Synuclein aliquotiert, lyophilisiert und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2 Fluoreszenzmarkierung von α-Synuclein

Rekombinantes α-Synuclein wurde mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor-488-O-Succinimidylester bzw. Alexa Fluor-647-O-Succinimidylester (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) markiert. Dies ermöglichte eine Untersuchung der α-Synuclein-Aggregation mittels konfokaler Einzelmolekülspektroskopie. Auch dieses Verfahren wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Giese durchgeführt (Högen 2009). Stabile Farbstoff-Protein-Konjugate wurden über eine kovalente Verknüpfung des als Succinimidylester vorliegenden Farbstoffes mit den primären Aminogruppen des entsprechenden Proteins erstellt. Jedes α-Synuclein-Monomer wurde im Mittel ein- bis zweifach markiert. Dazu wurde der Fluoreszenzfarbstoff im stöchiometrischen Verhältnis von zwei zu eins im Vergleich zur molaren Konzentration des α-Synucleins eingesetzt (Endkonzentration des α-Synucleins: 30 µM). Die Bindung der Succinimidylester benötigte ein Reaktionsmilieu zwischen pH 7,5 und 8,5, welches durch Zugabe von 10 vol% einer 1 M Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)-Lösung (pH 8,5) erreicht wurde. Anschließend wurden die Proben für 12 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Die ungebundenen Farbstoffmoleküle des Reaktionsansatzes wurden in zwei Filtrationsschritten mittels PD10 Säulen (GE Healthcare, Solingen, Deutschland) chromatographisch abgetrennt. Die Äquilibrierung erfolgte mit 50 mM Natrium-Phosphat (NaPi)-Puffer pH 7,0. In sechs Zentrifugierungsschritten (Eppendorf Zentrifuge 5810,

RSwing angle A462) in Amicon-Ultra-4 Röhrchen (5000 kDa MW) wurden verbliebene freie Farbstoffmoleküle abgetrennt und die α -Synucleinlösung umgepuffert und aufkonzentriert. Mittels FCS wurde das markierte α -Synuclein hinsichtlich der Markierungsrate, der Diffusionszeit und der Partikelzahl evaluiert sowie die Partikelzahl des freien Farbstoffes in einem Zwei-Komponenten-Fit als Qualitätskontrolle bestimmt. Die Stammlösung wurde bei 45000 x g für 30 min zentrifugiert (Optima MAX-XP, Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und mittels SIFT-Messung auf die Anwesenheit von präformierten Aggregaten untersucht. Die Stammlösungen wurden im Anschluss aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.3 Konfokale Molekülspektroskopie

Die Möglichkeit konfokale Molekülspektroskopie durchzuführen, wurde von der Arbeitsgruppe des Herrn Prof. Dr. Giese zur Verfügung gestellt (Högen 2009). Ähnliche Untersuchungen auf den Gebieten der Prionforschung und allgemeinen Proteinaggregation, z.B. die Dissertation von Tobias Högen, dienten mir als Anleitung und Vorlage. Die α -Synuclein-Aggregate wurden durch die Verwendung von Alexa-488- und Alexa-647-markierten α -Synuclein-Monomeren fluoreszenzmarkiert. Zur Charakterisierung der verschiedenen α -Synuclein-Oligomere wurden drei Bereiche der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie eingesetzt: die Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungsanalyse (engl. *Fluorescence Intensity Distribution Analysis*, FIDA), das Scannen nach intensiv fluoreszierenden Zielstrukturen (engl. *Scanning for Intensely Fluorescent Targets*, SIFT) und die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (engl. *Fluorescence Correlation Spectroscopy*, FCS). Die theoretischen Grundlagen der FCS-, FIDA- und SIFT-Methode sind von Schwille, Kask, Bieschke und Giese beschrieben worden (Schwille et al. 1997; Schwille et al. 1997; Kask et al. 1999; Bacia and Schwille 2003; Bieschke et al. 2004; Giese et al. 2005; Högen 2009). In dieser Arbeit sollen nur das Prinzip der Messmethode und die verschiedenen Analyseverfahren kurz beschrieben werden.

2.2.4 Messaufbau

Das Aggregationsverhalten von fluoreszenzmarkiertem rekombinantem α -Synuclein wurde mittels konfokaler Einzelmolekülspektroskopie (Schwille et al. 1997; Schwille et al. 1997; Giese et al. 2004; Giese et al. 2005; Högen 2009) in einem *Insight-Reader* untersucht (Evotec-Technologies, Hamburg, Deutschland). Ein *Insight-Reader* ähnelt im Grundaufbau einem konfokalen Mikroskop. Alle Proben werden mittels eines Argon-Ionen-Lasers (488 nm) und eines Helium-Neon-Lasers (633 nm) mit einem 40x Wasserimmersionsobjektiv (40x

NA 1,2, Olympus, Japan) bei RT untersucht. Die Messungen erfolgen in 96-Multiproben-Platten (96well Platten, Evotec-Technologies/Perkin Elmer, Hamburg, Deutschland) in einem Reaktionsvolumen von $30\mu\text{l/well}$. Das gemessene Fokusvolumen wird aus den Laserfokussen gebildet und beträgt ca.1 Femtoliter.

Nach Anregung der fluoreszierenden Partikel im Lasermessfokus werden Photonen emittiert, welche retrograd dem Weg des Anregungslichts entgegen durch die Objektivlinse über zwei dichroische Spiegel und eine Lochblende (engl. *Pinhole*, Durchmesser $70\mu\text{m}$) auf zwei getrennte Einzelphotonendetektoren (Avalanche-Photodioden, APD) geleitet werden (Abb. 10: Messaufbau des Insight Readers).

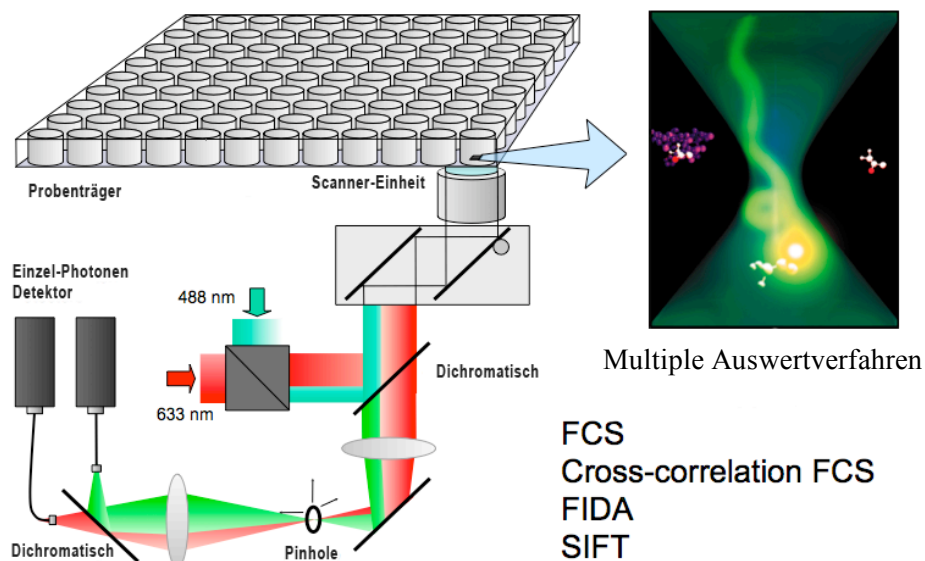


Abb. 10: Messaufbau des Insight Readers

Schematische Darstellung des Zwei-Farben-FCS-Readers mit Beams Scanner-Einheit aus dem Lehrvortrag von Prof. Dr. Giese. Das Laserlicht wird über einen dichromatischen Spiegel und die konfokale Optik des Mikroskops in das Probenvolumen fokussiert. Das emittierte Fluoreszenzlicht kommt über denselben Weg zurück, passiert jedoch den Dichroit und wird über ein *Pinhole* auf die Einzel-Photonen-Detektoren (Avalanche-Photodioden) abgebildet. Hierbei sind Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS), Fluoreszenz-Intensitäts-Verteilungs-Histogramm (FIDA), Scannen nach hochintens fluoreszierenden Zielstrukturen (SIFT)-Messungen möglich.

2.2.5 Justage und Messbedingungen

Vor Inbetriebnahme wurde der Messaufbau justiert, um vergleichbare Messergebnisse zu erhalten. Alle Messungen und Arbeiten wurden bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Sowohl der Argon-Laser (488 nm) als auch der Helium-Neon-Laser (633 nm) wurden auf die Anregungsleistungen von $200\mu\text{W}$ (488 nm Laser) bzw. $300\mu\text{W}$ (633 nm Laser) eingestellt. Anschließend erfolgte die Justage des Pinhole und der Glasfaserleitung sowie die Einstellung des optischen Korrekturrings am Objektiv mit einer freien Farbstofflösung (Alexa 488 und

Alexa 647) als Referenzwert. Die Messzeit betrug 10-15 s pro Einzelmessung (30 µl Reaktionsansatz). Die Länge des *Scan*-Pfades wurde auf 100 µm, die Frequenz des mobilen Fokus (engl. *Beams scanner*) auf 50 Hz und die Distanz der Probentischverschiebung auf 2000 µm festgesetzt. Daraus resultierte eine Geschwindigkeit von

$$v_{\text{scan}} = 2 * 100 \mu\text{m} * 50 \text{ Hz} = 10 \text{ mm/s},$$

mit der sich der Messfokus durch die Probe bewegt.

2.2.6 Analyseverfahren der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie

Bei der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie wird das Detektionsvolumenelement durch den Lasermessfokus definiert. Durch den Ein- und Austritt fluoreszenzmarkierter Partikel in einem mobilen Messfokus kann die Fluoreszenzsignalfuktuation gemessen und durch verschiedene Analyseverfahren ausgewertet werden.

2.2.6.1 FIDA

Die FIDA-Analyse ermöglicht die Charakterisierung und Unterscheidung verschiedener Molekülspezies hinsichtlich ihrer spezifischen Helligkeitsintensität (Fearnley and Lees 1991; Kask et al. 1999; Högen 2009). Bei der FIDA-Messung wird die Intensitätsverteilung in konsekutiven Zeitintervallen statistisch mit dem Programm FCSP Evaluation Software Version 2.0 (Evotec Technologies, Hamburg, Deutschland) ausgewertet. Es werden die Photonenzahlen in Zeitintervallen von konstanter Länge (engl. *Bins*, typischerweise 40 µs) innerhalb der Einzelmessung ermittelt. Die Anzahl der pro Zeitintervall detektierten Photonen und die Häufigkeit dieser Ereignisse werden dann durch einen FIDA-Multikomponenten-Fit statistisch analysiert. Dadurch können unterschiedliche fluoreszierende Oligomerspezies auf der Basis ihrer spezifischen molekularen Intensität identifiziert werden. Bei der FIDA-Analyse kann jede Oligomerspezies anhand der für sie spezifischen Intensität (Q , in kHz) und einer durchschnittlichen Konzentration im Lasermessfokus (C) unterschieden werden.

2.2.6.2 SIFT

Eine weitere Darstellung der konfokalen Einzelmolekülspektroskopie erfolgt über ein zweidimensionales Intensitätsverteilungshistogramm der hochsensitiven SIFT-Messung (Bieschke et al. 2004), welches mittels 2D-SIFT Software Modul (Evotec-Technologies, Hamburg, Deutschland) ausgewertet wird. Bei der SIFT-Analyse wird das Fluoreszenzsignal

fortlaufend in Zeitintervallen von konstanter Länge (40 μ s; *Bins*) unterteilt und aufgezeichnet. Dadurch können hochintense Fluoreszenzsignale von Hintergrundsignalen über eine Schwellensetzung unterschieden werden. Die Anzahl dieser Signale korreliert mit der Konzentration der fluoreszenzmarkierten Zielmoleküle (engl. *Intensely Fluorescent Targets*) und kann bis in den femtomolaren Bereich hinein detektiert werden (Giese et al. 2000; Bieschke et al. 2004; Högen 2009). Die gewonnenen Daten der SIFT-Messungen werden analog zur 2D-FIDA in einem zweidimensionalen Fluoreszenzintensitätsverteilungshistogramm (Punktwolke) visualisiert (Abb. 11: 2D-FIDA- und SIFT-Methode).

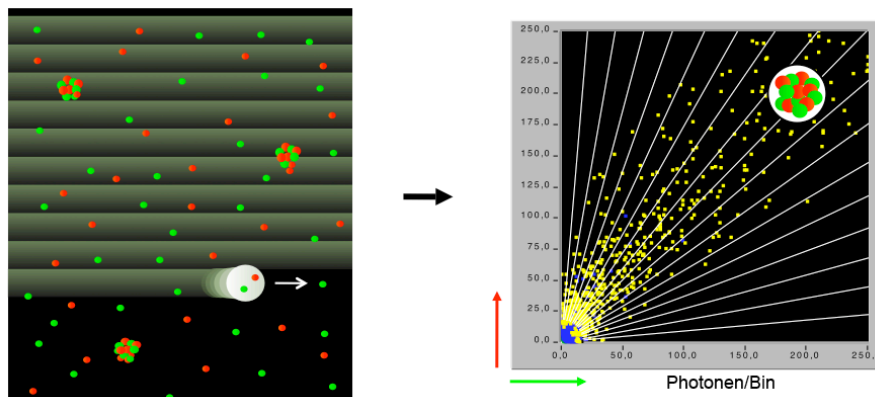


Abb. 11: 2D-FIDA- und SIFT-Methode

Schematische Darstellung der SIFT-Messung aus dem Lehrvortrag von Prof. Dr. Giese, bei der Lasermessfokus durch das Probenvolumen mändriert. Im zweidimensionalen Intensitätsverteilungshistogramm wird die Anzahl der Bins mit gleichen Werten für die erfassten grünen und roten Photonen in ihrer Häufigkeit farblich kodiert dargestellt.

2.2.7 Aggregationsansatz

Basierend auf den Ergebnissen von Kostka et al. 2007 wurden die Arbeiten zur α -Synuclein-Aggregation in der Arbeitsgruppe von Prof. Giese weiterentwickelt. So wurde vor Experimentbeginn das markierte α -Synuclein in 50 mM Tris-HCl-NP-40 pH 7,0 verdünnt und mittels FCS analysiert. Nonidet P-40 kurz NP-40 ist ein nichtionisches, nicht denaturierendes Detergenz, welches daher die Strukturen des α -Synuclein bei Verdünnung nicht verändert. Es wurden die Diffusionszeit sowie die Konzentration bestimmt und außerdem wurde getestet, ob präformierte Aggregate vorliegen.

Zwei Protokolle zur Aggregation des α -Synucleins wurden verwendet, beide basierten auf denselben Aggregations-Grundlagen. Hierzu erfolgte jeweils die Zugabe von einem organischen Lösungsmittel und Fe^{3+} . Die Unterschiede lagen in der Pufferzusammensetzung und den Inkubationszeiten. Sie werden daher als langes und kurzes Inkubationsprotokoll

beschrieben.

Langes Inkubationsprotokoll (Oligomere E0 und E1): Diese α -Synuclein-Oligomere wurden erstmals von (Danzer et al. 2007) präpariert und beschrieben. Die Oligomere wurden nach diesem Protokoll präpariert und zum Teil im Rahmen einer Kooperation von Boehringer zur Verfügung gestellt. Die Oligomere E0 und E1 wurden durch Lösen des lyophilisierten α -Synucleins ($7\ \mu\text{M}$) in 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.0, in Gegenwart von 20 % EtOH, präpariert. Im Fall der Typ E1-Oligomere wurde zusätzlich die Endkonzentration von $10\ \mu\text{M}$ FeCl_3 (J.T. Baker, Griesheim, Deutschland) zugefügt, während Typ E0-Oligomere ohne FeCl_3 präpariert wurden. Nach vierstündigem Schütteln (GFL, Burgwedel, Deutschland) wurden die Oligomer-Präparationen lyophilisiert und in 50 mM Natriumphosphat-Puffer, pH 7.0, in Gegenwart von 10 % EtOH gelöst. Anschließend wurden die Proben für 24 h (stage 5, Thermomixer 5436; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) bei Raumtemperatur (RT) geschüttelt und das restliche EtOH verdampft. Weitere 6 Stunden Inkubation mit geschlossenem Deckel führten zu den fertigen Oligomer-Präparationen.

Kurzes Inkubationsprotokoll (Oligomere D0 und D1): Für die D1-Oligomere wurde lyophilisiertes α -Synuclein ($7\ \mu\text{M}$) in 50 mM HBSS, pH 7.0, mit 1 % DMSO (v/v) und $10\ \mu\text{M}$ FeCl_3 inkubiert, während D0-Oligomere in Abwesenheit von Fe^{3+} -Ionen gebildet wurden. Nach 4 Stunden Schütteln bei RT waren beide Oligomer-Typen bereit für die Verwendung.

Alexa-488/Alexa-647-markierte Oligomere wurden nach dem gleichen Protokoll wie die unmarkierten Oligomere präpariert, indem Alexa-488/Alexa-647-Monomere verwendet wurden. Die Oligomere (D0, D1, E0, E1) und Monomere wurden 1:100 im extrazellulären Puffer für Elektrophysiologie (EZL) (siehe Kapitel 2.4.4) verdünnt. Alle Messungen wurden als Triplikate durchgeführt.

Tab. 1: Aggregations-Protokolle

Zusammensetzung der verschiedenen Oligomerpräparationen				
Monomere	D0-Oligomere	D1-Oligomere	E0-Oligomere	E1-Oligomere
$7\ \mu\text{M}$ α -Synuclein	$7\ \mu\text{M}$ α -Synuclein	$7\ \mu\text{M}$ α -Synuclein	$7\ \mu\text{M}$ α -Synuclein	$7\ \mu\text{M}$ α -Synuclein
	1 % DMSO	1 % DMSO	10 % EtOH	10 % EtOH
		$10\ \mu\text{M}$ FeCl_3		$10\ \mu\text{M}$ FeCl_3
HBSS	HBSS	HBSS	50 mM NaPi	50 mM NaPi

Präparationsprotokoll				
Oligomerarten	D0-Oligomere	D1-Oligomere	E0-Oligomere	E1-Oligomere
Reaktions- protokoll	Alle Oligomere 4 h bei RT schütteln			
			Lyophilisierung	
			Resuspendiert im Medium	
			Schütteln für 24 h bei offenem Deckel	
			Schütteln für 6 Tage bei geschlossenem Deckel	

2.3 Primäre Zellkultur

2.3.1 Autaptische Kultur

Zur Analyse der synaptischen Übertragung wurden neuronale Primärzellkulturen aus den Hippokampi junger FvB-Mäuse präpariert und auf sogenannte Astrozyteninseln kultiviert. Synapsen, welche sich zwischen dem Axon und den Dendriten des gleichen Neurons ausbilden, nennt man Autapsen.

2.3.1.1 Herstellung einer adhärenenten Astrozytenschicht

Autaptische Mikroinselkulturen wurden wie in vorangegangenen Arbeiten beschrieben präpariert (Rosenmund et al. 1993; Rosenmund et al. 1995; Priller et al. 2009)(Priller). Zur Gewinnung von Astrozyten wurde der Kortex von 1 Tag alten FVB-Mäusen in warmer HBSS (engl. *Hank's Balanced Salt Solution*) herauspräpariert und von allen anderen Bestandteilen befreit. Unter sterilen Bedingungen wurde der Kortex zur enzymatischen Zersetzung in mit Trypsin versetzter HBSS (37 °C, 4,5 ml HBSS + 0,5 ml Trypsin) 5 min mit einer Pipette trituriert. Anschließend wurde die enzymatische Reaktion mit DMEM und 5 % fetalem Rinderserum (eng. *Fetal Bovine Serum*, FBS) bei 37 °C gestoppt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (3 min, 1000 rpm, RT), der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in DMEM mit 4.5 g/l Glukose (Pan, Aidenbach, Germany), 5 % FBS (Pan, Aidenbach, Deutschland), 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), N2-Zusatz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), Glutamax (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) und Mitoserum (BD Biosciences, Bedford, MA) resuspendiert. Die so erhaltenen Zellen wurden für mindestens zwei Wochen in Gewebekulturflaschen (80 cm²) mit 5 ml 10 % FBS-DMEM-Medium bei 37 °C inkubiert. Durch Behandlung mit Trypsin-EDTA (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurden die Astrozyten vom Flaschenboden gelöst, in 10 % FBS-DMEM-Medium aufgenommen und mechanisch mit einer Pipette getrennt. Die Reinigung der Zellen

erfolgte über eine Zentrifugation (1000 rpm, 3 min) und anschließender Resuspendierung in 10 % FBS-Medium. Die Astrozyten wurden mit einer Dichte von 5000-10000 Zellen auf die Deckgläschen (Ø 18mm) ausgesät. Die Deckgläschen wurden zur Vorbehandlung in Aceton entfettet, anschließend in 1N HCl aufgeraut, mit destilliertem Wasser und 70 % EtOH gespült und in 96 % EtOH gelagert. Vor Verwendung wurden die Deckgläschen abgeflammt und mit einer 0,15 %igen Agarose-Lösung beschichtet. Mittels eines Gemischs aus Poly-D-Lysin, Collagen und Essigsäure wurden kleine Punkte (engl. *dots*) in die Beschichtung gestempelt (Abb. 12: Autaptische Kultur, A). Durch die Mikroinsel-Präparationen wurde sichergestellt, dass Neurone nur auf dem Astrozytenrasen wachsen (Bekkers and Stevens 1991). Nach fünf Tagen wurde durch Zugabe von 5-Fluoro-2'-deoxyuridin (FUDR, 8,1 mM) die Proliferation von Astrozyten gehemmt. Alle Zellen wurden bei 37 °C, 10 % CO₂ / 90 % Luft inkubiert.

2.3.1.2 Herstellung autaptischer, neuronaler Primärzellkulturen

Eine Woche nach der Astrozytenrasenpräparation wurden hippokampale Neurone präpariert. Die Herstellung hippokampaler, autaptischer Kulturen erfolgte nach einem Protokoll von Bekkers und Stevens bzw. Rosenmund und Stevens aus den Hirnen neugeborener Mäuse (Bekkers and Stevens 1991; Rosenmund and Stevens 1996; Priller 2006). Die Präparation der Hippokampi aus dem Hirn fand in eiskalter Hanks-balancierter Salzlösung statt (HBSS, Pan, Aidenbach, Deutschland). Unter sterilen Bedingungen wurden die Neurone der Hippokampi mittels 500 µl Papain-Lösung über eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln enzymatisch aus dem Gewebeverbund herausgelöst. Die Enzymlösung wurde entfernt und die Papainreste wurden durch Inkubation für 10 min in einer Enzym-Inhibierungslösung inaktiviert. Die Hippokampi wurden trituriert und anschließend in serumfreiem B27/Neurobasal Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) bei 37 °C gelöst. Mit einer Endkonzentration von 10⁵ Zellen/ml wurden diese in DMEM, 10 mM HEPES und 10 % Pferdeserum (GIBCO Life Technologies, Grand Island, NY) kultiviert. Die dissoziierten Neurone wurden in einer Dichte von 7500 Neurone/ml auf den schon präparierten Astrozytenrasen ausgesät. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator für 18-20 Tage kultiviert (Scholz and Byrne 1987). Nur einzeln liegende Neurone, die mit ihrem Axon und ihren Dendriten eigene Synapsen, sogenannte Autapsen, ausbilden, wurden für die elektrophysiologischen Untersuchungen verwendet (Abb. 12: Autaptische Kultur, B, C). Kortikale Neuronen-zellkulturen wurden nach dem gleichen Protokoll erstellt. Es wurde dafür der Kortex und nicht der Hippokampus präpariert und die Zellen wurden in 96-well Platten kultiviert.

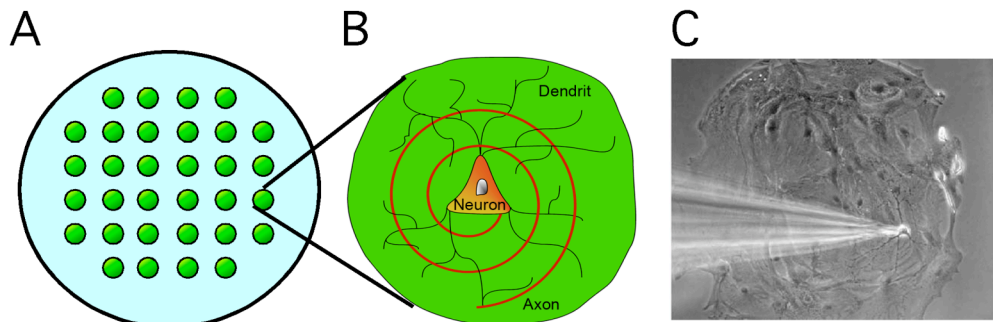


Abb. 12: Autaptische Kultur

A Schematische Darstellung einer Mikroinsel-Kultur auf einem Deckgläschen (Ø 18mm)

B Schematische Abbildung eines Neurons auf einem Astrozytenrasen

C Foto einer Mikroinsel-Kultur inkl. *Patch-Pipette* (PP)

2.3.1.3 Lösungen

Tab. 2: DMEM (5 % FBS) und NBA-Medium

DMEM (5 % FBS)	
DMEM (4,5 g/l Glukose)	459 ml
FBS inaktiviert	25 ml
Glutamax 100x	5 ml
Penicillin/Streptomycin 10000 I.E.	5 ml
MITO in 10 ml Aqua dest.	5 ml
N2-Supplement 100x	5 ml

NBA-Medium	
NBA	480 ml
B27-Supplement	10 ml
Glutamax 100x	5 ml
Penicillin/Streptomycin 10000 I.E.	5 ml

Tab. 3: DMEM-Enzymlösung und 0,01 M PB-Puffer

DMEM-Enzymlösung	
Cystein	1 mg
CaCl ₂ (100 mM)	0,05 ml
EDTA (50 mM)	0,05 ml
Papain 300 U/ml	0,165 ml
DMEM (4,5 g/l Glukose)	5 ml

0,01 M PB-Puffer	
Albumin	12,5 mg
Trypsin-Inhibitor	12,5 mg

Tab. 4: HBSS-Puffer und FUDR-Lösung

HBSS-Puffer	
HBSS	100 ml
Gentamicin (50 mg/ml)	0,5 ml
Fungizone (250 µg/ml)	0,5 ml
Penicillin/Streptomycin 10000 I.E.	5 ml

FUDR-Lösung	
5-Fluoro-2'- deoxyuridin	25 mg
Uridin	62,5 mg
DMEM (4,5 g/l Glukose)	12,5 ml

2.4 Elektrophysiologie

Die *Patch-Clamp*-Technik ermöglicht es, sowohl transmembrane Ströme der gesamten Zellmembran von Neuronen als auch den Strom durch einzelne Ionenkanäle zu messen. Weiterhin kann das Membranpotential der *gepatchten* Zelle moduliert werden. Dieses spezielle Spannungs-Klemm-Verfahren (engl. *Voltage-Clamp*) verhindert Änderungen des Membranpotentials der zu untersuchenden Zelle. Dies wird über einen negativen Rückkopplungsmechanismus ausgelöst, bei dem das Membranpotential gemessen und mit der Sollspannung verglichen wird. Bei Abweichungen von Sollspannung und gemessener Spannung wird ein entgegengerichteter Strom über einen aktivierten Regler in die Zelle injiziert. Dieser Kompensationsstrom repräsentiert den Ionenstrom durch eine Membran und kann mittels des *Patch-Clamp*-Aufbaus gemessen werden.

Bei der *Patch-Clamp*-Technik wird eine Glaskapillare mit einer ca. 1µm großen Öffnung unter visueller Kontrolle auf die Zelloberfläche aufgesetzt und die Membran mit leichtem Unterdruck angesaugt. Die Glaspipette ist mit einer artifiziellen Intrazellulärflüssigkeit gefüllt (IZF) und bildet mit einer chlorierten Silberelektrode die *Patch*-Elektrode. Aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen Zellmembran und Glaspipette entsteht ein spontaner Abdichtungswiderstand im Bereich von mehreren Gigaohm, welcher als engl. *Gigaseal* bezeichnet wird. Der Membranfleck (engl. *Patch*) ist somit elektrisch isoliert und die Zell-angelagerte (engl. *Cell Attached*) Konfiguration wird erreicht. Ausgehend von dieser Konfiguration kann durch Erhöhung des Unterdrucks die Ganzzell (engl. *Whole-Cell*)-Konfiguration durch einen Zellmembrandurchbruch erreicht werden. Hier entsteht ein direkter Zugang zum Cytosol und man erreicht eine Ganzzelleableitung (siehe Abb. 13: Generierung der *Whole-Cell-Konfiguration*). Es kommt zu einem Austausch der IZF aus der *Patch*-Pipette mit dem Zellplasma, so dass sich ein definiertes Ionenverhältnis im Inneren der Zelle ergibt, welches durch die IZF bestimmt wird. Am Verstärker wird eine nominelle Haltespannung der

Zelle von -70 mV eingestellt. Der Zugangswiderstand (Serienwiderstand R_S) beträgt 4,5 bis 9 M Ω , während Zellen mit größerem R_S als 15 M Ω verworfen werden. Über eine manuelle Serienwiderstandskompensation des EPC 9 kann der R_S zu mehr als 70 % kompensiert werden. Der Leckstrom beträgt weniger als 20 pA, bei größerem Leckstrom wird das Experiment abgebrochen. Nach Erreichen der *Whole-Cell*-Konfiguration und Einstellung des Haltepotentials wird durch kurze Depolarisation auf 0 mV über 1 ms am Soma des autaptischen Neurons ein Aktionspotential ausgelöst. Das Aktionspotential breitet sich über das Axon aus und löst letztendlich die Transmitterfreisetzung in dem synaptischen Spalt aus. Die postsynaptischen Rezeptoren werden durch den freigesetzten Transmitter aktiviert. Diese Aktivierung kann kurz nach dem Aktionspotential als exzitatorischer postsynaptischer Strom (engl. *Excitatory PostSynaptic Current*, EPSC) registriert werden.

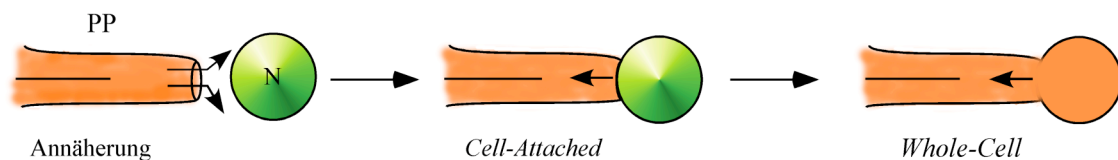


Abb. 13: Generierung der *Whole-Cell*-Konfiguration

- A** Annähern der *Patch-Pipette* (PP) an das Neuron (N) unter Überdruck, um ein Verschmutzen der Öffnung zu vermeiden.
- B** *Gigaseal* wird unter leichtem Unterdruck etabliert
- C** Die Zellmembran wird unter Beibehaltung des *Gigaseal* durch kurzes kräftiges Saugen durchbrochen und das Zytoplasma tauscht sich mit der IZF aus der PP aus.

2.4.1 *Patch-Clamp*-Elektroden

Die Elektroden werden aus Borosilikatglas-Kapillaren (Innendurchmesser 0,9 mm, Außendurchmesser 1,5-1,8 mm, KIMAX-51°, Kimble Products) mittels eines Vertikalpullers (PA-10, E.S.F., Göttingen) in zwei Zugschritten gefertigt. Für die Ganzzellableitungen von autaptischen Hippokampusneuronen werden Pipetten mit einem Widerstand von 3-4 M Ω verwendet.

2.4.2 Aufbau des Messplatzes

Die Untersuchungen erfolgen mittels eines inversen Mikroskops (Axiovert 135, Zeiss, Oberkochen), ausgestattet mit einem 20er Objektiv (20x/0,4 Korr, LD Achromplan, Zeiss, Deutschland). Das mikroskopische Bild wird zur besseren Überwachung mittels einer Digitalkamera (CF 15/4, KAPPA, Gleichen) auf einem Monitor abgebildet. Die Probe wird in einer Badkammer, die über dem Objektiv durch zwei Mikromanipulatoreinheiten in

horizontalen Ebene justiert wird, positioniert und mit einer Durchflussrate von 1,5 – 2 ml/min mit der Extrazellulärlösung gespült. Die *Patch-Clamp*-Einheit besteht aus einem motorgesteuerten Mikromanipulator (LN SM1, Luigs & Neumann, Ratingen) und der eigentlichen *Patch-Clamp*-Apparatur. Der Mikromanipulator verfügt über einen Vorverstärker, einen Pipettenhalter für die *Patch*-Pipetten und über einen Erdungsseingang für die Badelektrode. Der Operationsverstärker, der den Kompensationsstrom reguliert, ist Teil des Vorverstärkers. Das analoge Stromsignal wird vom Vorverstärker zum *Patch-Clamp*-Verstärker (EPC 9, HEKA, Lambrecht) geleitet, welcher über ein Computersystem (Macintosh, G4) angesteuert wird. Das analoge Stromsignal wird durch den AD-Wandler des EPC 9 unter Verwendung der Software Pulse 8.50 (HEKA) digitalisiert dargestellt. Ein angebrachter zweiter Mikromanipulator (Patchman, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) ist mit einer Aufnahmevorrichtung für Quarzglas kapillaren (Innendurchmesser 430 μm , Polymicro Tech, USA) ausgestattet. Diese Kapillaren werden über Schläuche mit einem ventilgesteuerten System zum schnellen Austausch von Lösungen (Warner Instruments, USA) verbunden. Die Ventile können manuell oder extern über einen Stimulationsgenerator (Tib 14, HEKA, Lambrecht, Deutschland) angesteuert werden. Um Vibrationen zu vermeiden, wird der gesamte Messaufbau (Mikroskop, Vorverstärker, Mikromanipulator) auf einem schwingungsgedämpften Tisch (TMC) platziert. Die benötigte elektromagnetische Abschirmung wird über einen Faraday'schen Käfig erreicht, der übermäßiges elektrisches Rauschen während der Messungen verhindert. Alle elektrischen Komponenten des Setups werden geerdet, so dass das Rauschen bei elektrophysiologischen Messungen auf wenige Piko-Ampere (pA) reduziert wird. Eine schematische Darstellung des Messplatzes ist in Abb 13 (Abb. 14: Messaufbau) dargestellt.

2.4.3 Elektrische Eigenschaften der *Whole-Cell*-Konfiguration

Die Zellmembran lässt sich elektrisch durch ihren Widerstand (R_m) und eine dazu parallel angeordnete Kapazität (C_m) darstellen (Abb. 14: Messaufbau). Im *Whole-Cell*-Modus ist die Pipette mit dem Zellsoma leitend verbunden und es liegt zwischen Silberdraht und Soma der Serienwiderstand R_s an, der im Idealfall dem Pipettenwiderstand entspricht. Der Serienwiderstand erhöht sich über Membran-Fragmente, die sich im Mündungsbereich der Pipette befinden. Dies führt zur Verlangsamung der Umladung des Kondensators (C_m) und des Kompensationsmechanismus zur Regulation der Spannung. Dadurch werden die Leitfähigkeitsveränderungen zeitverzögert und verzerrt wiedergegeben, so dass das Potential der Zelle zeitweise vom Sollwert abweicht, was unerwünschte Depolarisationen der

Zellmembran induziert. Der *Patch-Clamp*-Verstärker verfügt über Schaltkreise, die diese Erhöhung des Serienwiderstandes kompensieren. Weiterhin kann während der Messungen ein erneutes Verschließen der Membran unter der *Patch-Pipette* (engl. *Resealing*) zu einer Erhöhung des Serienwiderstandes führen. Aufgrund dieser Tatsache muss während der laufenden Messung ständig der Serienwiderstand überprüft werden, um im Falle eines *Resealing* die *Whole-Cell*-Konfiguration wieder herzustellen oder gegebenenfalls die Messung abubrechen (Numberger and Draguhn 1996).

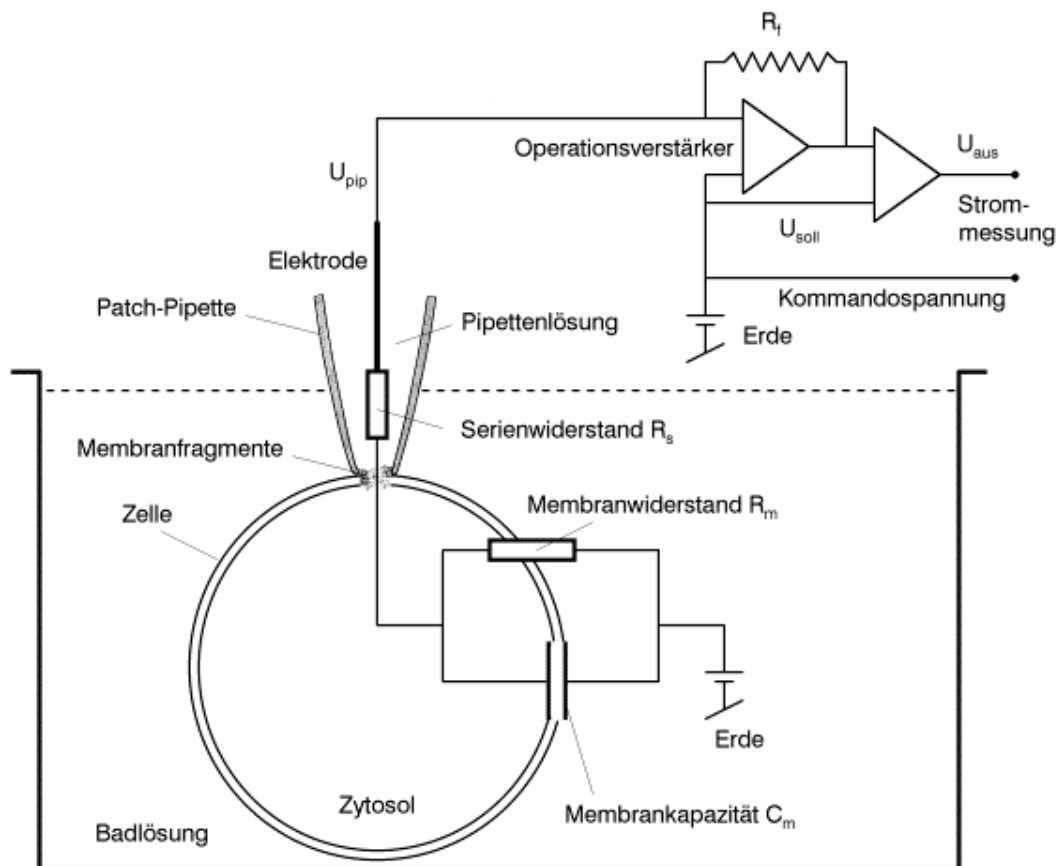


Abb. 14: Messaufbau

Vereinfachtes Schaltbild eines *Patch-Clamp*-Verstärkers und Ersatzschaltbild der Ganzzelleableitung: R_f : Rückkopplungswiderstand, U_{soll} : Kommando- oder Sollspannung, U_{pip} : Pipettenpotential, U_{aus} : Ausgangsspannung proportional zum Strom. Der Schaltkreis des Verstärkers, der einen sogenannten Strom-Spannungswandler darstellt, ist nahe bei der Pipette in einem kleinen Kästchen, dem Vorverstärker, untergebracht. Nach dem Durchbrechen der Membran erhält man die Ganzzell-Konfiguration. Dabei werden Membranfragmente und anderes Zellmaterial in die Nähe der Pipettenmündung gesaugt, was den Serienwiderstand R_s erhöht (Mergler, Stefan: Description of patch-clamp techniques Stand: 10. Mai 2013. <http://patch-clamp.info/techniques/techniques.htm> (abgerufen am 10. Mai 2013)).

2.4.4 Lösungen

Tab. 5: EZL für non-NMDA-Ströme und EZL für NMDA-Ströme

non-NMDA-Ströme	
NaCl	140 mM
HEPES	10 mM
CaCl ₂	1 bzw. 4 mM
MgCl ₂	4 mM
KCl	2,4 mM
Bicuculline	0,015 mM
pH 7,3 (NaOH), 300 mOsm	

EZL für NMDA-Ströme	
NaCl	140 mM
HEPES	10 mM
CaCl ₂	4 mM
CNQX	0,005 mM
KCl	2,4 mM
Bicuculline	0,015 mM
Glycin	0,02 mM
pH 7,3 (NaOH), 300 mOsm	

Tab. 6: IZF für (non)-NMDA-Ströme

IZF für (non)-NMDA-Ströme	
NaCl	10 mM
K ⁺ -Gluconat	125 mM
MgCl ₂	4,6 mM
EDTA	1 mM
Kreatinphosphat	15 mM
Phosphokreatinkinase	20 U/ml
Na ₂ -ATP	4 mM
pH 7,3 (NaOH), 300 mOsm	

2.4.5 Messung synaptischer Ströme in Hippokampusneuronen

Um bei den Messungen nur exzitatorische Neuronen zu untersuchen, wurden inhibitorische Zellen durch den Zusatz von Bicuculline (GABAA-Antagonist, 15 μ M) blockiert. Die Glasplättchen mit den Neuronen wurden in die mit Extrazellulärlösung (EZL, 37 °C) gefüllte Badkammer gelegt. Die synaptischen Ströme wurden nur von solchen Neuronen abgeleitet, die einzeln auf einer Astrozyteninsel lagen. Diese Neurone bilden nur mit sich selbst Synapsen aus, sogenannte Autapsen. Nach Erstellung des *Giga-seals* befindet sich die Zelle im *Cell-Attached*-Modus. Die kapazitiven Ladeströme (c-fast-Kompensation) wurden ausgeglichen und das Membranpotential wurde auf -70 mV eingestellt. Die Membran wurde unter ruckartigem Ansaugen der *Patch*-Pipette in den *Whole-Cell*-Modus überführt. Dadurch kam es zu einer Erhöhung des Serienwiderstandes R_s , welcher durch die

Serienwiderstandskompensation ausgeglichen wurde. Die kapazitiven Ladeströme können über die *c-slow*-Kompensation des *Patch-Clamp*-Verstärkers kompensiert werden. Anschließend wurde kurz in die Stromklemmanordnung (*Current-Clamp*-Modus) des *Patch-Clamp*-Verstärkers umgeschaltet und durch Einstellung des Stromes auf 0 mV das Ruhemembranpotential bestimmt. Es wurden nur Zellen verwendet, deren Ruhemembranpotential < -50 mV war.

2.4.5.1 Messung der Spontanaktivität von exzitatorischen postsynaptischen Strömen (EPSCs)

Zur Untersuchung der Spontanaktivität wurden die Ströme für 60 s bei -70mV aufgezeichnet. Die Daten wurden gefiltert und mittels einer Vorlage (engl. *Template*) eines idealen sEPSCs erstellt und mit Axograph 4.5 (Molecular Devices, USA) ausgewertet.

Zur Detektion der sEPSC wurde die Funktion *Scaled Template* in Axograph 4.5 (Molecular Devices, USA) verwendet (Clements and Bekkers 1997). Zuerst wurde folgende doppelt exponentielle Funktion als *Template* definiert:

$$f(t)=\exp(-t/\text{rise-time}) - \exp(-t/\text{decay-time})$$

Die weiteren Parameter wurden wie folgt festgelegt:

<i>Template-Amplitudenausschlag (t)</i>	20 pA
<i>Template-Ansteigszeit (rise-time)</i>	0,5 ms
<i>Template-Abstiegszeit (decay-time)</i>	5 ms
Ausgangslinie bis zum Ereignis	5 ms
totale <i>Template</i> -Länge	30 ms

Diese Parameter entsprachen möglichst genau dem mittleren Zeitverlauf der sEPSC. Das *Template* lief als Detektionsvorlage über die Datenspur und erkannte so sEPSCs.

Die detektierten sEPSCs wurden pro Zelle gemittelt und nach Amplitude, Ladung und Frequenz analysiert.

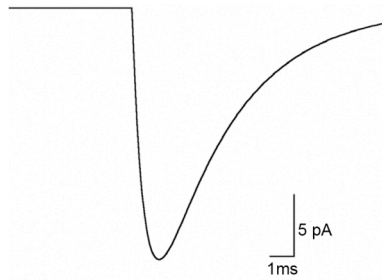


Abb. 15: Mini-Template

Auf das Muster treffen die im Text beschriebenen Parameter zu. Es stellt ein idealisiertes sEPSC dar und konnte so als Detektionsvorlage bei der Analyse genutzt werden.

2.4.5.2 Messung Aktionspotential-induzierter Ströme

Die Zellmembran wurde für 1 ms vom Ruhemembranpotential -70 mV auf 0 mV depolarisiert, so dass ein Aktionspotential (AP) induziert wurde. Die dadurch resultierende Vesikelausschüttung zwischen der Prä- und Postsynapse führte zu einer Transmitterbindung an den *non-NMDA*- bzw. NMDA-Rezeptoren und damit zu einem Na^+ -Ioneneinstrom. Über *Patch-Clamp*-Untersuchungen im *Whole-Cell*-Modus waren diese Ableitungen als EPSC messbar und wurden definitionsgemäß als negative Ströme dargestellt.

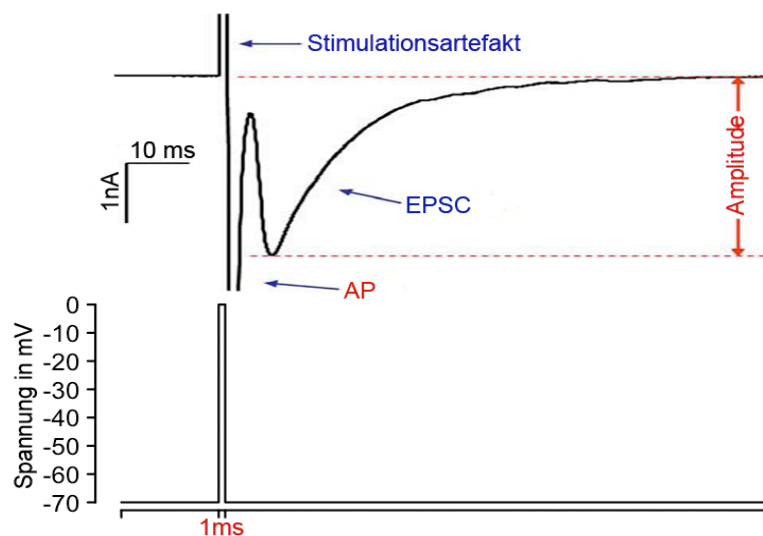


Abb. 16: EPSC und Stimulationsprotokoll

Durch Depolarisation (1 ms) auf 0 mV wurde ein Aktionspotential am Zellsoma ausgelöst. Ein schneller Einstrom positiver Ladung in die Zelle zeichnete ein AP aus. Man sieht einen Na^+ -Einstrom sowie einen K^+ -Ausstrom. Das darauf folgende EPSC führte noch während der Rückbildung des positiven Einstroms durch Öffnung postsynaptischer Kationenkanäle ebenfalls zu einem negativen Ausschlag. Dieser Ionenstrom war langsamer und die maximale Stromstärke war geringer.

2.4.5.3 Amplitude bei *non*-NMDA-Strömen und NMDA-Strömen

Sowohl bei den *non*-NMDA-Strömen als auch den NMDA-Strömen wurden ausgehend vom Ruhemembranpotential (-70 mV) die Zellen 5 x auf 0 mV mit einer Frequenz depolarisiert. Die Amplitude der resultierenden EPSCs wurde aufgezeichnet.

Non-NMDA-Ströme: Die *non*-NMDA-Ströme wurden mit einer Frequenz von 1 Hz depolarisiert.

NMDA-Ströme: NMDA-Ströme wurden bei einer Frequenz von 0,1 Hz gemessen. Der Badlösung wurden 5 μ M CNQX (6-Cyano-7-nitroquinoxalin-2,3-dion), 20 μ M Glycin und 15 μ M Bicuculline zugesetzt, wobei kein externes Mg^{2+} beigefügt wurde.

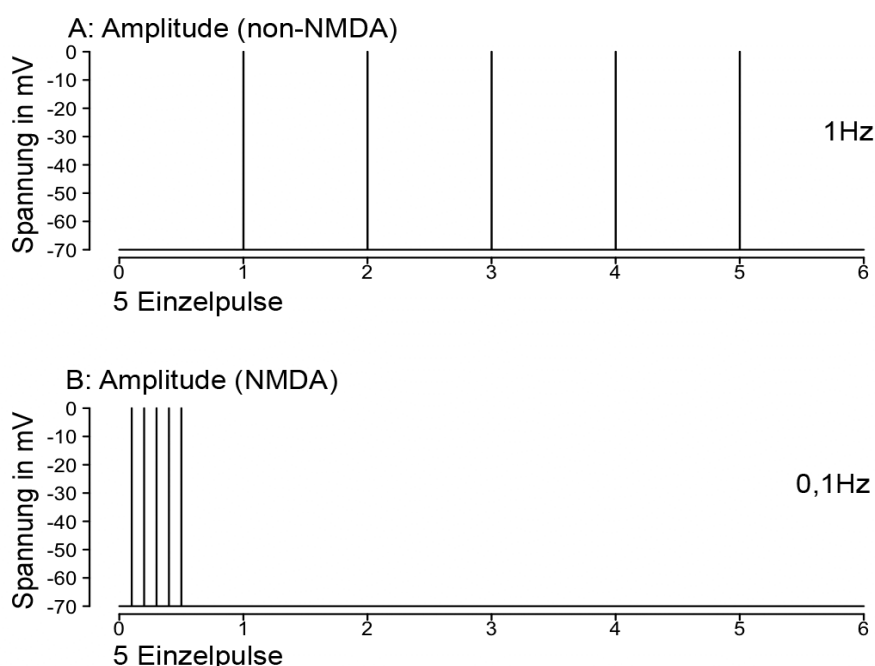


Abb. 17: Stimulationsprotokoll der Amplituden-Messung

Bei den Neuronen wurde durch Depolarisation für die Dauer von 1 ms auf 0 mV ein Aktionspotential am Zellsoma ausgelöst:

A Für *non*-NMDA-Rezeptoren vermittelte Ströme bei 1 Hz.

B Für NMDA-Rezeptoren vermittelte Ströme bei 0,1 Hz.

2.4.5.4 Doppelpulsstimulation

Die Kurzzeitplastizität der Zellen wurde gemessen, indem Zellen mit gepaarten Pulsen (engl. *paired pulse*) in Intervallen von 25-500 ms stimuliert wurden. Dafür wurden die autaptischen Neurone zweimal in kurzen Abständen ebenfalls durch eine 1 ms dauernde Depolarisation stimuliert. Die Amplitudenhöhen der beiden EPSCs wurden ausgemessen und in ein Verhältnis zueinander gesetzt. Dieses Verhältnis bildete sich aus dem Quotienten der

Amplitude der zweiten Stimulation zur ersten. Ein Verhältnis größer als Eins beschreibt eine Doppelpulsverstärkung, ein Wert kleiner als Eins eine Doppelpulserniedrigung. Die Ausprägung des jeweiligen Effekts ist vom Stimulationsintervall abhängig. Durch kürzere Abstände zwischen den Pulsen vergrößert sich die Amplitudendifferenz im Gegensatz zu längeren Intervallanständen, da sich die EPSCs stärker beeinflussen. Für jede Zelle wurden die Amplituden aus 3 Durchgängen in das Verhältnis zueinander gesetzt und dann gemittelt. Da die Kurzzeitplastizität auch abhängig vom extraellulären Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) ist, wurden alle Versuche zur Doppelpulsstimulation sowohl bei niedriger (1 mM) als auch bei hoher (4 mM) extrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration durchgeführt. Eine niedrige $[\text{Ca}^{2+}]_e$ führte zu einer Doppelpulsverstärkung (engl. *paired pulse facilitation*) und eine hohe $[\text{Ca}^{2+}]_e$ führte zu einer Doppelpulserniedrigung (engl. *paired pulse depression*). Die Amplituden der EPSCs wurden mit dem Programm Pulse 8.6 (HEKA) gemessen.

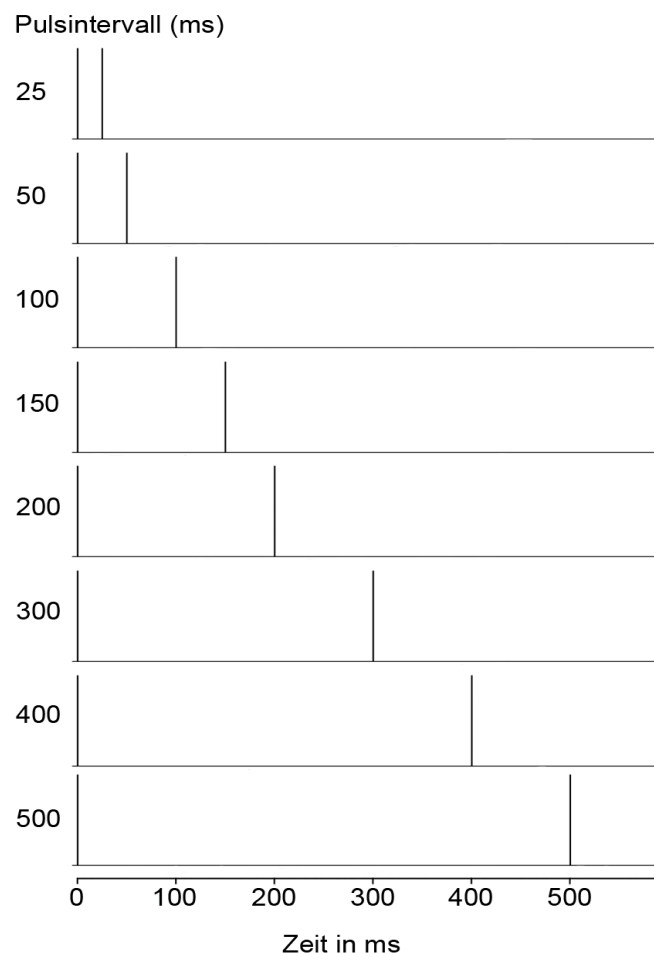


Abb. 18: Stimulationsprotokoll für die Doppelpulsversuche

Jeder Balken steht für einen Stimulationspuls, wie oben beschrieben. Die 8 verschiedenen Pulsintervalle liefen hintereinander mit einer Pause von jeweils 2 Sekunden automatisch ab. Das Protokoll wurde mindestens dreimal pro Zelle durchgeführt

2.4.5.5 Applikation von monomerem α -Synuclein und α -Synuclein-Oligomer-Präparationen

Unter Verwendung von elektrophysiologischen Messverfahren (engl. *Patch-Clamp*) wurde der Effekt der α -Synuclein-Monomere und Oligomere auf die synaptische Übertragung untersucht. Hierbei wurden die α -Synuclein-Spezies durch Akutapplikation der extrazellulären Lösung zugefügt. Die Messungen wurden vor und nach Applikation von Lösungsmittelkontrollen an Monomeren und Oligomer-Präparationen durchgeführt.

Durch fünfmalige Depolarisation mit einer Frequenz von 1 Hz (*non*-NMDA-Ströme) oder 0,1 Hz (NMDA-Ströme) wurde die Amplitude der EPSCs gemessen. Es folgte eine Doppelpulsstimulation mit einem Pulsabstand von 25 bis 500 ms. Anschließend wurde die Spontanaktivität über einen Zeitraum von 180 ms aufgezeichnet, wobei jeweils nach 60 s manuell 10 μ l der jeweiligen α -Synuclein-Präparation über eine Schlauchkapillare, die in der Nähe der untersuchten Zelle positioniert war, appliziert wurde. Es folgten wiederum die Messung der Amplitude stimulierter EPSCs und die Doppelpulsstimulation.

2.4.6 Messprotokoll

180 s	Untersuchung der Spontanaktivität
5x	Stimulierte Ströme für 1 ms auf 0 V
3x	Doppelpulsstimulation
3x60 s	Untersuchung der Spontanaktivität, nach 60 s Applikation der α -Synuclein-Präparationen
3x	Doppelpulsstimulation
5x	Stimulierte Ströme für 1 ms auf 0 V
180 s	Untersuchung der Spontanaktivität

2.4.7 Datenaufnahme und Auswertung

Unter Verwendung des Programms Pulse 8.50 (HEKA) wurden die *Patch-Clamp*-Ableitungen aufgezeichnet und über Axograph 4,5 (Molecular Devices, USA) und Pulse Fit (HEKA) ausgewertet. Die Darstellung der aufgenommenen Daten erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL (Microsoft), die statistische Auswertung mit EXCEL-WinStat. Die Unterschiede zweier Mittelwerte wurden als signifikant eingestuft, wenn sie einen p-Wert < 0,05 (T-Test) aufwiesen. Bei allen Mittelwerten wurde der Fehler als Standardfehler des arithmetischen Mittels angegeben (engl. *Standard Error of the Mean*, SEM) (Sachs, 1997).

2.5 Vitalitätstest

Zur Bestimmung des toxischen Einflusses von α -Synuclein-Oligomeren wurde nach deren Applikation ein MTT-Proliferationstest durchgeführt. Dieser Test ist ein quantitativer kolorimetrischer Test, der lebende Zellen über ihre mitochondriale Stoffwechselaktivität nachweist. Das gelbliche MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) wird durch mitochondriale Dehydrogenasen in einer NADH-abhängigen Reaktion unter oxidativer Aufspaltung des Tetrazolringes zu einem lilafarbigem Formazan umgebaut. (Abb. 19: MTT-Farbstoffumwandlung). Die Farbintensität und Zellvitalität sind zueinander direkt proportional.

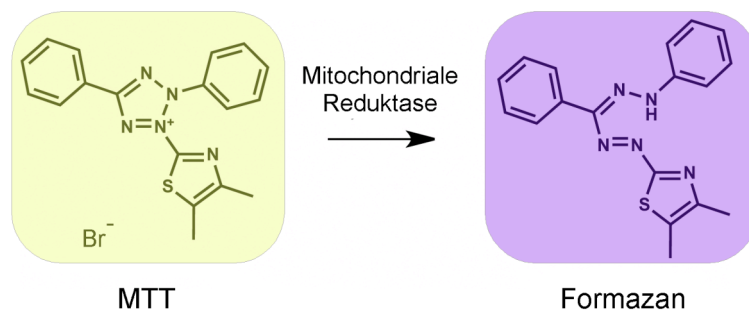


Abb. 19: MTT-Farbstoffumwandlung

Der MTT-Test wurde in 96-well-Platten (Nunc-GmbH, Wiesbaden) gemäß des Herstellerprotokolles (MTT Cell Growth Assay Kit, Invitrogen) durchgeführt. Als Kontrolle der Eigenabsorption wurden einerseits nur das Medium und andererseits das Medium inklusive Zellen gemessen. Die Proben beinhalteten 50000 kortikale Neurone pro 100 μ l Nährmedium. Untersucht wurden die α -Synuclein-Präparationen (100 nM) und die zugehörigen Kontrollen.

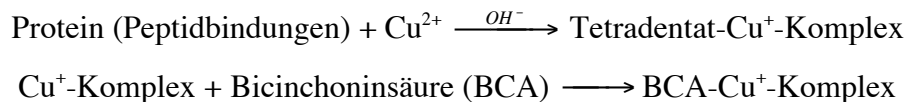
Nach Ansetzen der Proben wurden diese für 48 Stunden bei 37 °C und in einer 5-prozentigen CO₂-Atmosphäre inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l MTT-Reagenz (5 mg/ml) zugeführt und unter den gleichen Bedingungen nochmals für vier Stunden inkubiert. In dieser Zeit erfolgte die beschriebene enzymatische Reaktion. Um etwaige Formazan-Kristalle zu lösen, die die Absorptionsmessung beeinträchtigen, wurden nach der Inkubationsphase je 100 μ l SDS-Lösung (100 mg/ml) zugefügt und über Nacht unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Absorption wurde in einem ELISA-Mikrotiterplattenleser (engl. *Microtiter-Plate-Reader*) (Fluostar Optima, BMG Labtech) bei 500 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 630 nm gemessen. Als Nullwert wurde die Extinktion in einem zellfreien Ansatz bestimmt, der aber die jeweiligen Lösungen und das Medium enthielt.

2.6 Nachweis von Proteinen mittels Western Blot

Nach der Herstellung von α -Synuclein-Oligomeren wurde deren Oligomerisierung über SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und anschließendem Western Blot überprüft. Nur so kann sichergestellt werden, dass bei den unter Kapitel 2.4.5 beschriebenen Akutexperimenten auch tatsächlich Oligomere appliziert werden.

2.6.1.1 Protein-Konzentrationsbestimmung (Mikro BCA-Test)

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde mittels eines *Micro BCA Protein Assay Reagent Kits* (Pierce, Rockford, IL, USA) durchgeführt. Das Prinzip des BCA-Tests beruht auf einer Farbreaktion von Bicinchoninsäure (BCA) mit Cu^+ -Ionen. Diese entstehen durch eine vom Protein verursachte Reduktion der Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Umgebung (Biuret-Reaktion). Die Cu^+ -Ionen ergeben einen intensiv gefärbten Komplex mit je zwei Molekülen BCA, der durch seine Absorption bei 562 nm nachgewiesen wird (Smith et al. 1985; Wiechelman et al. 1988).



Ein Vorteil dieser Methode gegenüber ähnlichen Verfahren wie z. B. dem Nachweis nach Bradford (1976) ist, dass die Messung auch in Anwesenheit von Detergenzien wie SDS erfolgen kann. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zur Erstellung der 8-Punkt-Kalibriergeraden wurden BSA-Konzentrationsstandards in einem Bereich von 0 bis 2000 $\mu\text{g/ml}$ mitgeführt. Die Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung nach einer Inkubationsdauer von 20 min bei 37 °C. Die Proteinproben wurden analog vermessen und anhand der Standardkurve wurde die Konzentration der Proteine ermittelt.

2.6.1.2 Vorbehandlung der Proben

Alle Proben wurden mit *LBS-Sample Buffer (NuPAGE® Sample Reducing Agent 10X*, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) angesetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert, danach kurz zentrifugiert und in Gel-Taschen aufgetragen.

2.6.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels einer denaturierenden SDS-

Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli (Weber and Osborn 1969). Hierbei wurde die Eigenladung von Proteinen überdeckt und durch Aufheizen auf 95 °C wurden die Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proben aufgebrochen. Durch den Einsatz von reduzierenden Thiolverbindungen (β -Mercaptoethanol, Dithiothreitol, DTT) wurden die Disulfidbrücken durch Reduktion gespalten (Richter 2003). Für die Elektrophorese wurde ein 12 %iges BisTris-Gel (NuPage, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) mit MOPS/SDS Laufpuffer (NuPage, Invitrogen, Aufspaltungsbereich von 10 kDa bis 80 kDa) verwendet. Die Proben liefen mit 1 x Lämmli-Puffer mit 0,1 % SDS nach 10 min bei 80 V im Sammelgel ein und wurden anschließend bei 150 V bis zur gewünschten Trennstrecke weitergeführt. Als Marker diente Seebblue (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), ein Molekulargewichtsstandard von 4 bis 250 kDa mit vorgefärbten Eichproteinen.

2.6.1.4 Western Blot

Nach Auftrennung der Proteine über eine SDS-PAGE wurden diese mittels Elektrottransfer auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Immobilon P, Millipore, Schwalbach, Deutschland) übertragen (*Blotting*). Die Membran wurde vor Verwendung 30 s in Methanol aktiviert und mit Wasser gereinigt.

Für den Transfer wurden das Gel und die PVDF-Membran oben und unten durch jeweils zwei mit Transferpuffer befeuchtete Filterpapiere isoliert. Der anschließende Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte für 1,5 h in einem Elektrobloetter (peqlab, Erlangen). Die Membran mit den transferierten Proteinen wurde für 30 min bei RT mit Absättigungspuffer, ein Phosphatpuffer mit Tween und Milch (PBSTM; Milch 3%), inkubiert, um offene Bindungsstellen abzusättigen. Der Primärantikörper (1:3000 GluR1, polyklonal, Millipore; 1:3000 NMDA-Rezeptor, polyklonal Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg, 1:3000 15G7, monoklonal, Millipore) wurde für 12 h bei 4 °C auf dem Schüttler (Elmi Ltd. Riga, Lettland) angelagert. Nach der Antikörperinkubation wurde die Membran mehrmals mit Tris-Salz-Puffer (TBS) (3 x 10 Minuten) gewaschen. Hier wurden wiederum mit PBSTM die unspezifischen Bindungsstellen geblockt. Zum Nachweis des Primärantikörpers wurde die Membran mit einem Sekundärantikörper, einem polyklonalen Ziegen gegen Ratte (engl. *goat anti rat*) oder Ziegen gegen Hase IgG (engl. *goat anti rabbit*), der an alkalische Phosphatase gekoppelt war, (1:2000 in Absättigungspuffer; Dako, Hamburg) für 45 min bei RT inkubiert. Durch alkalischen Puffer sowie Nitroblau-tetrazoliumchlorid (NBT, Roche, Mannheim, Deutschland) und 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP, Roche, Mannheim) konnte eine Farbreaktion induziert werden, welche über die Ausbildung eines violett-blauen

Farbstoffkomplexes sichtbar wurde. Für die Detektion über Lumineszenz wurde die Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten polyklonalen Sekundärantikörper (1:2000 *Amersham ECL mouse* in Absättigungspuffer, Amersham, Freiburg, Deutschland) inkubiert und anschließend erneut wie oben beschrieben gewaschen. Die Signale wurden mittels Chemilumineszenz (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, England) detektiert, indem die aus der Peroxidase-vermittelten Oxidation von Luminol resultierende Lichtemission über das Kamerasystem Chemocam Imager (Intas Science Imaging Instruments) detektiert wurde.

2.6.1.5 Lösungen

Tab. 7: Probenpuffer und 20xMOPS-Laufpuffer

Probenpuffer	
Tris-HCl	1,0244 g
Glycerin	10 %
SDS	2 %
DTT	5 %
H ₂ O ad 100 ml pH 6,8	

20xMOPS-Laufpuffer	
MOPS	209,2 g
Tris Base	121,2 g
SDS	20 g
EDTA	6 g
H ₂ O ad 1000 ml	

Tab. 8: Transferpuffer und 0,01 M PB-Puffer

Transferpuffer	
TRIS Base	3,03 g
Glycin	14,4 g
SDS	10 %
Methanol	10 %
H ₂ O ad 1000 ml	

0,01 M PB-Puffer	
NaCl	8,18 g
KCl	0,22 g
H ₂ O ad 1000 ml pH 7,4	

Tab. 9: Phosphatpuffer mit Tween (PBST) und Alkalischer Puffer

Phosphatpuffer mit Tween (PBST)	
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
Tween-20	2 ml
H ₂ O ad 1000 ml pH 7,2	

Alkalischer Puffer (TBS)	
TRIS Base	36,36 g
NaCl	5,84 g
MgCl ₂	1,02 g
H ₂ O ad 1000ml	

Tab. 10: NBT-Stock und BCIP-Stock

NBT-Stock	
NBT	50 mg
DMF 70 %	1 ml

BCIP-Stock	
BCIP	50 mg
DMF 100 %	1 ml

2.7 Biotinylierung von Zellmembranproteinen

Um die Zelloberflächenexpression der AMPA- und NMDA-Rezeptoren nach Applikation der α -Synuclein-Oligomere D1 zu untersuchen, wurde das *Cell Surface Protein Isolation Kit* (Pierce, Rockford, USA) nach Herstellerprotokoll verwendet.

Im Folgenden soll das Prinzip des Experiments kurz beschrieben werden: Zu Beginn wird Biotin chemisch aktiviert. Dieses wird anschließend über eine kovalente Bindung an extrazelluläre Lysinreste membranständiger Proteine angelagert. Über eine folgende Zellyse separiert man die mit Biotin-markierten Proteine. Dies erfolgt über die Bindung an eine Avidinsäule, so dass sie von dem restlichen Zelllysate separiert werden. Die Elution erfolgt mittels Dithiothreitol (DTT), wobei die Disulfidbindungen im Protein gespalten werden (Abb. 20: Isolierung von Zellmembranproteinen). Um die Zellmembranproteine vom DTT zu trennen, wird das Eluat via Aceton präzipitiert. DTT würde die folgende Proteinkonzentrations-Bestimmung mittels eines BCA-Tests stören. Die Expression der AMPA- und NMDA-Rezeptoren wird in der Membranfraktion spezifisch mit einem Antikörper mittels Western Blot nachgewiesen. Der Western Blot wird nach dem unter Kapitel 2.6.1.4 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Die verwendeten Primärantikörper sind GluR1, (polyklonal, Millipore) für den AMPA-Rezeptor und NMDA-Rezeptor (polyklonal, Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg). Die passenden Sekundärantikörper sind *goat anti rat* oder *goat anti rabbit IgG*.

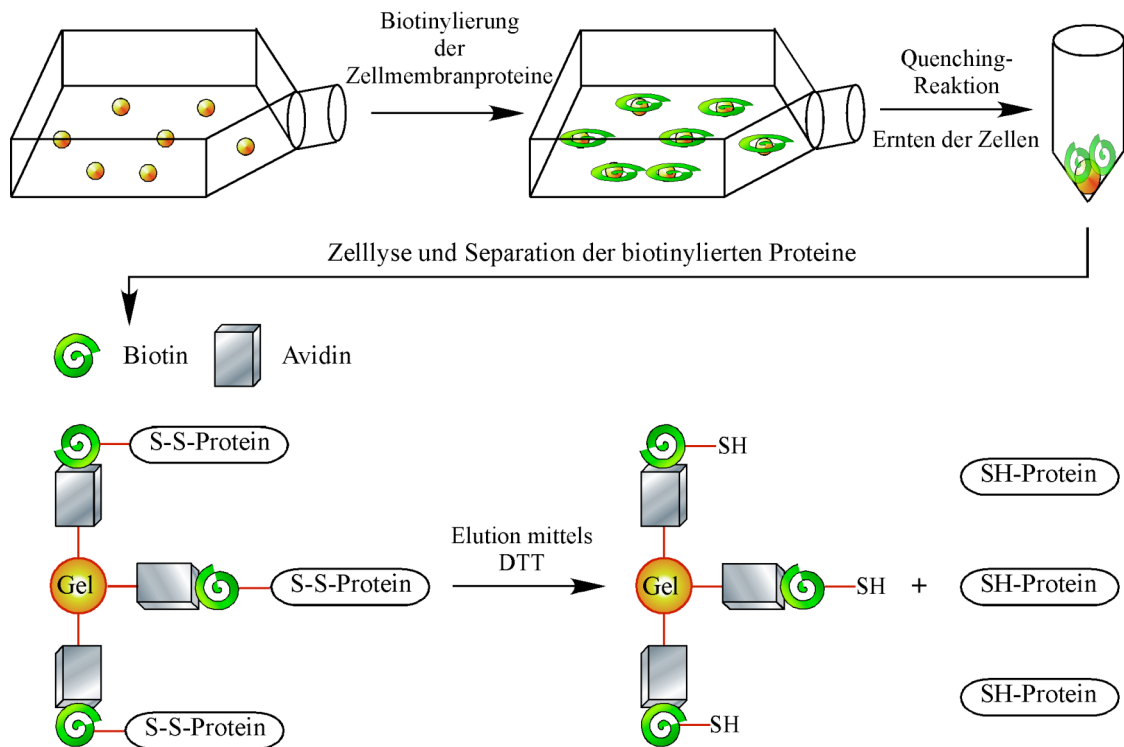


Abb. 20: Isolierung von Zellmembranproteinen

Über die kovalente Bindung von Biotin an zelluläre membranständige Proteine können diese anschließend über eine Avidinsäule vom restlichen Zellysate separiert und mittels DTT (Dithiothreitol) eluiert werden.

2.8 Synaptosomenpräparation

Alle Arbeitsschritte wurden im Kühlraum bei 4 °C durchgeführt und für sämtliche Zentrifugationsschritte wurden Kühlzentrifugen verwendet. Alle Proben wurden auf Eis verarbeitet oder gelagert. Es wurden ca. 8 Gehirne von 6 Wochen alten FvB-Mäusen grob zerkleinert und zusammen mit Puffer 1 (10 ml Puffer/g Gewebe) in einem Gewebe-Homogenisator über 12 Züge mit einem Teflon-Pistill (0.10 mm - 0.15 mm Toleranz, Kleinfeld Labortechnik, Gehrden, Deutschland) homogenisiert. Das Homogenat (H) wurde für 10 min. bei 1000 x g (Mikrozentrifuge, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand (S1) abgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Das Pellet (P1) wurde in Puffer 1 aufgenommen und für weitere 12 Züge im Potter homogenisiert. Das Homogenat wurde erneut für 10 min. bei 1000 x g zentrifugiert. Schließlich wurde der Überstand (S1') mit dem Überstand aus der ersten Zentrifugation vereinigt (S1+S1'). Da das Pellet (P1) hauptsächlich aus Zellkernen bestand, wurde dieses verworfen. Die vereinigten Überstände S1 + S1' wurden für 15 min. bei 12 000 x g zentrifugiert und der resultierende Überstand (S2, lösliche Proteine) wurde verworfen.

Das Pellet (P2) wurde mit Puffer 1 (5 ml Puffer/g Gewebe) resuspendiert und über 6 Züge homogenisiert und für 20 min. bei 12 000 x g zentrifugiert. Der Überstand (S2`) wurde verworfen und das Pellet (P2`) im Puffer 2 resuspendiert (1.5 ml Puffer/g Gewebe) und vorsichtig auf einen zwischenzeitlich präparierten Ficoll-Gradienten (6%/ 9%/ 12% Ficoll® PM 400, Sigma Aldrich, München, Deutschland) geschichtet. Die überschichteten Gradienten wurden für 1 h bei 85 000 x g zentrifugiert. Während der Zentrifugation trennten sich die im P2` enthaltenen subzellulären Bestandteile ihrer Dichte entsprechend auf. Das Myelin verblieb auf der Oberfläche des Gradienten zurück, die leichten Membranen konzentrierten sich an der Phasengrenze 9% und 12% Ficoll, die Synaptosomen an der Phasengrenze 6% und 9% Ficoll, die Mitochondrien pelletierten am Boden der Zentrifugenröhrchen. Die leichten Membranen und Synaptosomen wurden mit einer Pipette geerntet und nochmals für 10 min. bei 10 000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in Proteaseinhibitor-haltigem PBS (Pan, Aidenbach, Deutschland) resuspendiert und bis zur Bestimmung auf Eis gelagert. Die Proben konnten für ca. 6 h verwendet werden (Kinne 2011).

2.9 Ca²⁺-Imaging

2.9.1 Konfokale Mikroskopie

Bei der konfokalen Mikroskopie wird ein virtueller optischer Schnitt durch ein Objekt erzeugt. In einem konfokalen Lichtmikroskop entsteht ein Bild aus einer Überlagerung, indem nur das Licht erfasst wird, welches von einer einzigen Ebene des Präparates reflektiert oder emittiert wird. Licht außerhalb dieser Fokusebene wird durch ein *Pinhole* (Lochblende) ausgeblendet, so dass es vom Detektor nicht erfasst wird. Konfokal bedeutet, dass der Anregungs- und Detektionsfokus übereinander liegen (Abb. 21: Konfokale Mikroskopie).

Durch eine Lochblende wird das Licht fokussiert und somit nur die optische Information aus der Fokusebene gemessen. Dieses Prinzip der konfokalen Laser-Rastermikroskopie wurde 1955 von Marvin Minsky entwickelt. Ein Laser rastert das fokussierte Präparat pixel- und zeilenweise ab, so dass die Daten hinter dem *Pinhole* mit einem lichtsensitiven Detektor erfasst werden können. Von der zugehörigen Software wird ein punktwises Bild zusammengesetzt, so dass sich ein optischer Schnitt durch das Präparat darstellt. Der Blendendurchmesser, das Mikroskopobjektiv und dessen numerischer Apertur bestimmen die Dicke des optischen Schnittes. Die Dicke der abgebildeten Schicht kann bei sehr kleinem *Pinhole* auf Werte unter 1 µm eingegrenzt werden. Mehrere Ebenen des Präparats können in einem sogenannten Z-Stack zusammengefasst und als 3-dimensionale Abbildung des

Präparats dargestellt werden. Alle Aufnahmen von Zellen, die mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Fluo-4 geladen waren, wurden mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (LSM 510 Meta, Zeiss, Jena, Deutschland) aufgenommen. Um die individuellen Zellen oder Neurone rekonstruieren zu können, wurde ein Achroplan 40x/0,8W Objektiv verwendet.

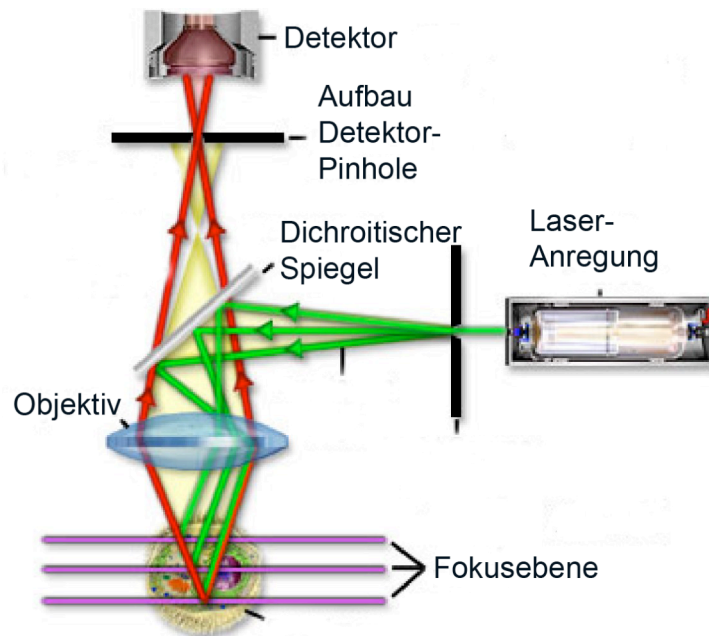


Abb. 21: Konfokale Mikroskopie

Prinzipieller Aufbau eines konfokalen Mikroskops nach (Bradbury and Evennett 1996).

2.9.2 Der Fluoreszenz-Indikator Fluo-4 AM

Die Änderungen der intrazellulären Kalzium-Konzentration wurden über die Umwandlung des Farbstoffs Fluo-4AM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gemessen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein sogenannter (engl.) *Single Wavelength Dye* verwendet, der eine Konzentrationsänderung über einen Anstieg der Fluoreszenzintensität anzeigt und nicht über die Verschiebung von Anregungs- oder Emissions-Wellenlänge darstellt. Zur Beladung der Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff wurde die veresterte Form des Fluo-4, das Fluo-4AM, verwendet (Exzitationsmaximum 488 nm, Emissionsmaximum 520 nm). Dieses Derivat weist mehrere Acetomethylgruppen auf, die mit den COO⁻-Gruppen des Fluo-4 verbunden sind. Diese werden in die Zellen transportiert und durch zelleigene Esterasen gespalten. Damit werden die Fluoreszenzfarbstoffe einerseits funktionell für die Komplexierung von Kalzium und andererseits unpermeabel für die Zellmembran. Fluo-4 besitzt gegenüber anderen Farbstoffen, wie z.B. Fura-2, Vorteile: Er zeigt eine schnelle und bessere Aufnahme durch Zellen weist nur eine geringe Eigenfluoreszenz in Abwesenheit von Kalzium auf die

Fluoreszenzemission stärker als bei anderen Indikatoren und ermöglicht eine besser zeitlich aufgelöste Messung. Die Anregung bei 488 nm ist weniger phototoxisch als ultraviolettes Licht, das für die Anregung von Fura-2 (340-360 nm) verwendet wird.

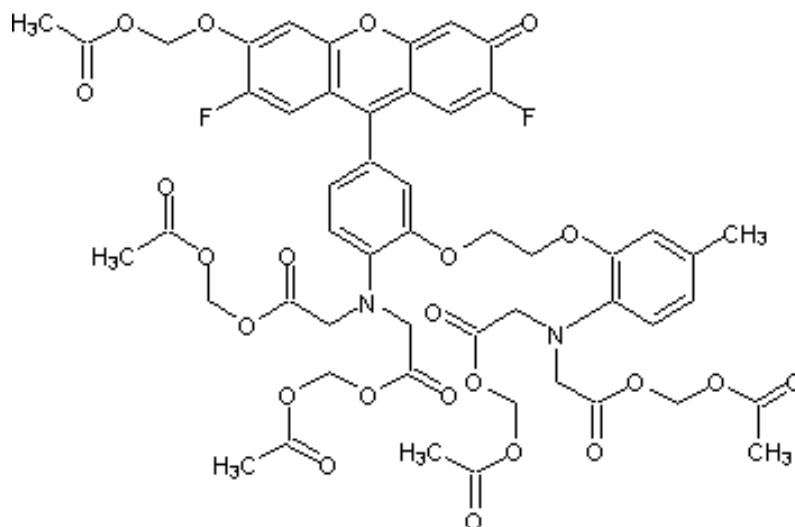


Abb. 22: Struktur von Fluo-4AM

2.9.3 Messung der zytosolischen Ca^{2+} -Ionen in Dendriten und Synaptosomen

Um in Zellen die freie intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zu messen, wurden diese zuvor mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fluo-4AM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) beladen. Dazu wurden die Zellen in HBSS mit einem 1:1 Gemisch bestehend aus DMSO und Pluronic F-127 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) versetzt, so dass eine Konzentration von 1 μM vorlag. Nach 45-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen zweimal mit HBSS-Komplettmedium gewaschen und untersucht.

Auch die Synaptosomen wurden mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff beladen, um die Änderungen des Ca^{2+} -Haushaltes zu bestimmen. Die Synaptosomen wurden auf 1 g/ml in HBSS resuspendiert und mit einem 1:1 Gemisch aus DMSO und Pluronic F-127 versetzt, so dass eine Konzentration von 1 μM vorlag. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Synaptosomen zweimal mit HBSS gewaschen und auf eine Konzentration von 0,1 g/ml resuspendiert. Die Proben wurden dann bis zur Messung auf Eis gelagert.

Die mit Fluo-4AM beladenen Neurone und Synaptosomen wurden mittels eines konfokalen Laser-Scan-Mikroskops mit einem 40x Wasserimmersionsobjektiv (LSM Zeiss; Achroplan 40x NA 0,75) in einer Klimakammer bei 37 °C und 5 % CO_2 untersucht. Ein Argon-Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm wurde zur Fluoreszenzanregung verwendet und die emittierende Fluoreszenz mit einem Bandpass-Filter (BP 500-550 nm), der vor dem Photomultiplier geschaltet wurde, detektiert. Der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzintensität

des Ca^{2+} -Indikators wurde mit einer Frequenz von 10 Hz aufgenommen und über die Formel

$$\Delta F/F_0 = 100 \times (F - F_r) / (F_r - B)$$

ausgewertet. Dabei ist F die gemessene Fluoreszenzintensität, F_r der Mittelwert der Fluoreszenzintensität von 10 Messungen vor Applikation des α -Synucleins und B der Mittelwert der Hintergrundfluoreszenz aus einer Region im Messfeld, das keine mit Farbstoff gefüllte Zelle enthält. Die Regionen von Interesse (engl. *Region Of Interest*; ROI) wurden im Anschluss an die Bildaufnahmen ausgewählt und mittels der Zeiss LSM 3.2 Software analysiert. Die Daten wurden mit Excel, Sigma Plot und Sigma Stat weiter verarbeitet.

3 Ergebnisse

3.1 Aggregationsverhalten des α -Synucleins

Die 2D-Intensitätsverteilungshistogramme der SIFT-Analyse zeigten bei Inkubation von monomerem α -Synuclein (7 μ M) bei RT für 4 h keine detektierbaren Aggregate (Abb. 23 A, Monomer). Die Zugabe von organischen Lösungsmitteln wie 1 % DMSO (D0) oder 10 % EtOH (E0) löste eine Oligomerisierung aus, die zu niedermolekularen Aggregaten führte (Abb. 23 B, Oligomer/D0, für E0 siehe (Danzer et al. 2007)). Zusätzliche Zugabe von 10 μ M Fe^{3+} zu den Lösungsmitteln führte zu signifikant größeren α -Synuclein-Aggregaten (D1, E1) im Vergleich zu nur mit DMSO- oder EtOH-induzierten Ansätzen. Der synergistische Effekt von Fe^{3+} auf die Bildung großer α -Synuclein-Aggregate in Zusammenhang mit organischen Lösungsmitteln stellte sich als hochintensives Signal in der SIFT-Analyse dar (Abb. 23 C, Oligomer/D1, für E1 siehe (Danzer et al. 2007)).

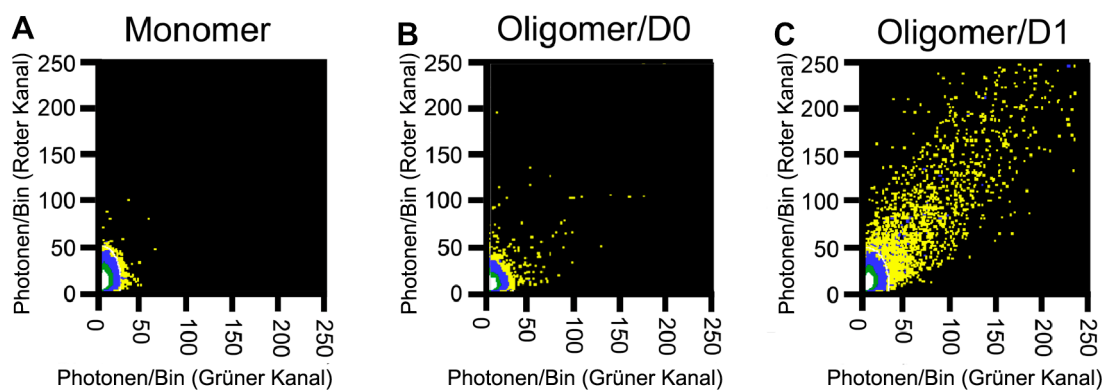


Abb. 23: SIFT-Analyse

Repräsentative 2D-Intensitätsverteilungshistogramme des Effektes von DMSO ohne bzw. mit Fe^{3+} auf die α -Synuclein-Oligomerisierung. Gezeigt wird der synergistische Effekt des Fe^{3+} im Rahmen des Aggregationsprozesses von Alexa488- und Alexa647-markiertem α -Synuclein. Dargestellt sind die SIFT-Befunde von α -Synuclein als unaggregierte Monomer-Präparationen, kurz "Monomere"(A) und nach stufenweiser Oligomerisierung in Gegenwart von 1 % DMSO (B) bzw. 1 % DMSO und 10 μ M FeCl_3 .

Als weitere biochemische Methode zur Charakterisierung des Aggregationsprozesses wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 24: Western Blot der verschiedenen α -Synuclein-Oligomer-Präparationen). In allen Präparationen konnten Monomere, Dimere, Trimere bis hin zu Heptameren dargestellt werden. Bei den in dieser Arbeit eingesetzten nanomolaren Proteinkonzentrationen kam es zu keiner *de novo* Aggregation von Monomeren.

Mittels Western Blot ließen sich jedoch nur kleinere Aggregate darstellen, da größere Aggregatspezies nicht in das Gel einwandern können. Daher schienen alle Präparationen Aggregate ähnlicher Größe aufzuweisen.

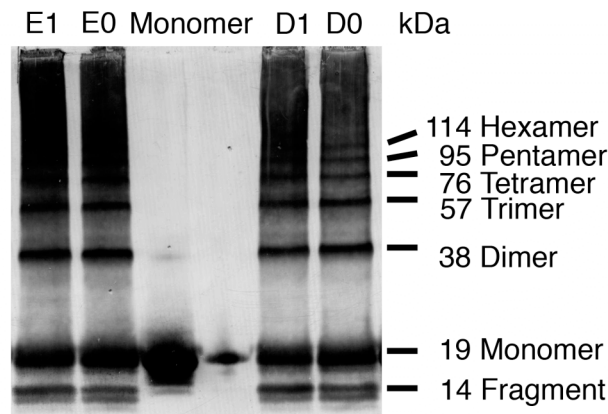


Abb. 24: Western Blot der verschiedenen α -Synuclein-Oligomer-Präparationen

Dargestellt sind die Banden von zellfrei aggregierten α -Synuclein-Oligomer-Präparationen (E0, D0, E1 und D1) unter Verwendung des 15G7-Antikörpers und Detektion durch Chemilumineszenz. α -Synuclein-Monomere finden sich in der 14 kDa Bande.

3.1.1 Charakterisierung der Aggregatgröße mittels FIDA

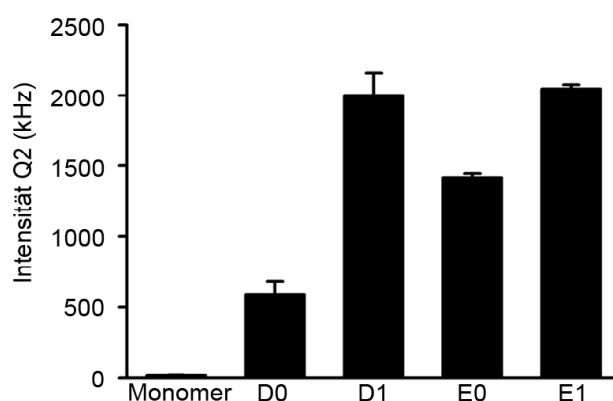
Für die Charakterisierung wurde zunächst die Partikelhelligkeit der α -Synuclein-Monomere und Oligomer-Spezies D0, D1, E0 und E1 bestimmt. Da die Partikelhelligkeit aus der Zahl der gemessenen Photonen pro Zeit hervorgeht, erfolgt die Angabe in Hz. Während nicht aggregierte Monomere eine Helligkeit in der Photonenmessung von ca. 20 kHz aufwiesen (Q1), zeigten die untersuchten Oligomere Photonen-Frequenzen von ca. 600-2000 kHz (Q2). Aus dem Vergleich der Partikelhelligkeiten konnten somit annähernd die Aggregatgrößen bestimmt werden. In Tab. 11 werden die Frequenzen der Photonen entsprechend der Partikelhelligkeit (Q1) und die Konzentration (C1) für monomeres α -Synuclein dargestellt. Die α -Synuclein-Monomer-Dichte wurde in FIDA-Messungen bestimmt und die Oligomer-Konzentrationen wurden mittels eines freien Fits berechnet (Frequenz der gemessenen Photonen (Q2) und Aggregatkonzentration (C2) (Kask et al. 1999; Giese et al. 2005; Levin et al. 2005; Kostka et al. 2008). Die Daten entsprechen dem Mittelwert von drei bis sechs unabhängigen Messungen in Dreifachbestimmung. Analog zu vorhandenen Untersuchungen am ZNP (Levin et al. 2005; Danzer et al. 2007; Kostka et al. 2008) teilte sich der Oligomerisierungsprozess in zwei Stufen auf: lösungsmittelinduzierte Oligomere (ca. 30-80mere) und lösungsmittel- und Fe^{3+} -induzierte Aggregate (ca. 120mere).

Tab.11: Auswertung der FIDA-Analyse

Quantitative FIDA-Analyse der Aggregatkonzentrationen (C1 und C2) und der Partikelhelligkeit (Q1 und Q2) für die untersuchten Aggregationsansätze.

	Ansatz α-Synuclein 10 μM	C1 Partikel/ Fokusvolmen	Q1 (kHz)	C2 Patikel/ Fokusvolumen	Q2 (kHz)
Ein-Komponenten Monomer	—	$15,77 \pm 0,64$	$21,72 \pm 0,38$	—	—
Zwei-Komponenten D0	1 % DMSO	$14,48 \pm 0,84$	$21,72 \pm 0,67$	$0,17 \pm 0,11$	$587,92 \pm 89,90$
D1	1 % DMSO 10 μ M FeCl ₃	$9,13 \pm 1,01$	$17,14 \pm 0,47$	$0,016 \pm 0,0133$	$2002,12 \pm 157,58$
E0	10 % EtOH	$17,40 \pm 0,88$	$19,33 \pm 0,13$	$0,0058 \pm 0,0002$	$1417,72 \pm 28,00$
E1	10 % EtOH 10 μ M FeCl ₃	$17,55 \pm 0,55$	$16,91 \pm 0,35$	$0,0056 \pm 0,0014$	$2049,92 \pm 28,39$

3.2 Effekte von α -Synuclein-Monomeren und -Oligomeren auf die synaptische Übertragung

**Abb. 25: FIDA-Aggregatgröße**

In FIDA-Analysen steht die Intensität der Photonen im Verhältnis zu Alexa-488-markierten α -Synuclein-Oligomeren-Aggregaten. Die Ergebnisse werden in der Frequenz der Photonenmessungen Q2 (kHz) angegeben, die mit der Partikelhelligkeit korrespondiert (Monomere: n=3, D0: n=6; D1: n=6; E0: n=3; E1: n=3;).

3.2.1 Stimulierte und spontane Neurotransmitterfreisetzung

3.2.1.1 Excitatory postsynaptic current (EPSC)

Der durch den α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionat (AMPA)-Rezeptor und N-Methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptor ausgelöste Kationen-Einstrom wird als exzitatorischer postsynaptischer Strom (engl. *Excitatory Postsynaptic Current*, EPSC) bezeichnet. Untersucht wurden die synaptischen Ströme von 18-20 Tage lang kultivierten hippokampalen Neuronen, die aus den Gehirnen von FvB-Mäusen gewonnen wurden. Das EPSC ist eine lokale Änderung des Membranpotentials an der postsynaptischen Membran von Nervenzellen, das ein Aktionspotential (AP) in der Postsynapse auslösen kann. Die Zellen wurden für 1 ms von -70 mV auf 0 mV depolarisiert und die resultierenden Amplituden der EPSC gemessen. Durch die somatische Depolarisation werden alle aktiven Synapsen eines Neurons stimuliert und man erhält eine Summenantwort. Die funktionelle Charakterisierung der synaptischen Transmission begann mit der Bestimmung der initialen Amplitude und Ladung des postsynaptischen Stroms. Die AMPA-Rezeptor-vermittelten EPSCs zeigten nach Applikation von Präparationen mit Fe^{3+} und Lösungsmittel-induzierten Aggregaten (D1 und E1) eine signifikant vergrößerte Amplitude im Gegensatz zu den Kontrollen. Auch die nur mit Lösungsmittel-induzierte Oligomer-Präparation E0 wies keinerlei Veränderungen bei den AMPA-Rezeptor-vermittelten EPSCs auf. Die genauen Messergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

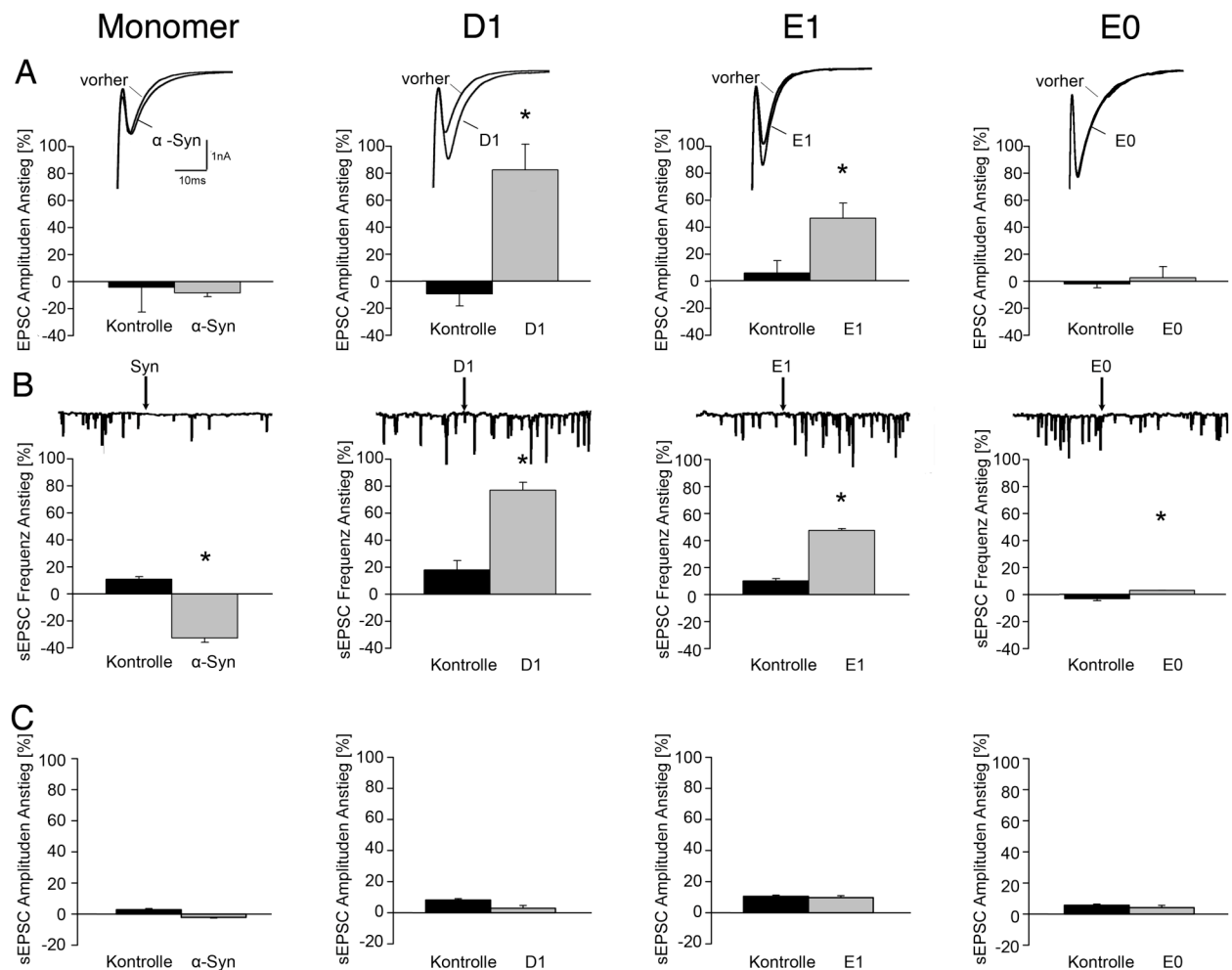


Abb. 26: Effekt der α -Synuclein-Präparationen auf die AMPA-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission.

Dargestellt sind die Effekte der α -Synuclein-Präparationen (Monomer, D1, E1, E0, D0; 100 nM) auf:

A die Amplitude der stimulierten AMPA-Rezeptor-vermittelten synaptischen Ströme.

B die Frequenz der spontanen EPSC (sEPSC).

C die Amplitude der spontanen EPSC (sEPSC).

Die Graphen geben die Effekte der α -Synuclein-Aggregate im Vergleich zu den Effekten der korrespondierenden Lösungsmittelkontrollen in Prozent wieder (* $p < 0,05$). Die Einfügungen in **A** und **B** zeigen repräsentative Ableitungen. Die Messungen erfolgten an Neuronen von 10 unabhängig voneinander präparierten Kulturen; Monomer ($n=26$), Oligomere D1 ($n=27$), E0 ($n=32$), E1 ($n=29$).

NMDA-Rezeptor-induzierte EPSCs wurden unter Zusatz von CNQX (5 μ M) und in Abwesenheit von extrazellulärem Mg^{2+} bei 4 mM $[Ca^{2+}]_e$ gemessen (Abb. 27). Die Amplituden der NMDA-Ströme zeigten sowohl nach α -Synuclein-Monomer- als auch nach α -Synuclein-Oligomer-Applikation eine Reduktion. Dieser Effekt scheint Oligomer unspezifisch zu sein.

Tab. 12: AMPA–Rezeptor-vermittelte EPSCs und sEPSCs

AMPA Anstieg	EPSCs Amplitude	sEPSC	
		Frequenz	Amplitude
Kontrolle	-4,27 ± 18,35 %	10,71 ± 1,99 %	2,82 ± 0,75 %
Monomer	8,48 ± 2,84 %	-32,82 ± 3,06 %	-2,07 ± 0,5 %
Kontrolle	-9,53 ± 8,95 %	17,90 ± 6,89 %	7,17 ± 0,83 %
D1-Präparation	82,16 ± 27,40 %	77,01 ± 5,75 %	2,54 ± 1,61 %
Kontrolle	1,87 ± 2,32 %	-3,25 ± 1,46 %	3,78 ± 0,74 %
E0-Präparation	2,65 ± 8,13 %	2,99 ± 0,04 %	3,65 ± 1,29 %
Kontrolle	5,55 ± 9,01 %	9,98 ± 1,70 %	9,23 ± 0,77 %
E1-Präparation	46,19 ± 11,15 %	47,37 ± 1,34 %	8,52 ± 1,09 %

Daten werden dargestellt als Mittelwert ± SEM; n = 20 –30 Zellen pro Messung.

3.2.1.2 *Spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs)*

Spontaneous excitatory postsynaptic currents, kurz sEPSCs, treten ohne vorangehende Stimulation durch Aktionspotentiale oder hypertone Lösung auf und weisen auf die Synapsengröße hin. Die Antwortkinetik wird durch die postsynaptische Rezeptordichte, Vesikelfüllung mit Neurotransmitter und das Schaltverhalten der Glutamat-Rezeptoren bestimmt. Die Frequenz der sEPSCs korreliert mit der Gesamtzahl der Vesikel im Pool der freisetzungsbereiten Vesikel (engl. *Readily releasable pool*, RRP). Sie drückt die Fusionseffizienz der Vesikel nach dem *Priming*, der biochemisch induzierten Fusionsbereitschaft, aus. Es wurden die Amplituden und die Frequenzen der sEPSCs von AMPA- und NMDA-Rezeptor-vermittelten synaptischen Strömen bestimmt. Neurone, die mit D1- und E1-Präparationen behandelt wurden, zeigten eine signifikante Erhöhung der sEPSC-Frequenz. Dieser Befund ist entweder durch eine erhöhte Ca^{2+} -Konzentration in der Präsynapse bedingt oder Abbild einer erhöhten Synapsendichte. Nach Zugabe von monomerem α -Synuclein und E0-Oligomer-Präparationen konnte kein Anstieg der sEPSC-Frequenz beobachtet werden (Abb. 26). Zusammengefasst erhöhte sich die Frequenz der sEPSCs bei der Applikation von D1- und E1-Oligomer-Präparationen mit einem signifikanten Unterschied zu den E0-Präparationen und Lösungsmittelkontrollen. Die Applikation von monomerem α -Synuclein verursachte eine signifikante Erniedrigung der Frequenz. Veränderungen in der Frequenz der NMDA-Rezeptor-medierten sEPSCs wurden unter der Applikation von sowohl monomerem α -Synuclein als auch der D1-Oligomer-Präparation beobachtet und weisen deshalb auf ein nicht α -Synuclein-Aggregat-spezifisches Phänomen hin.

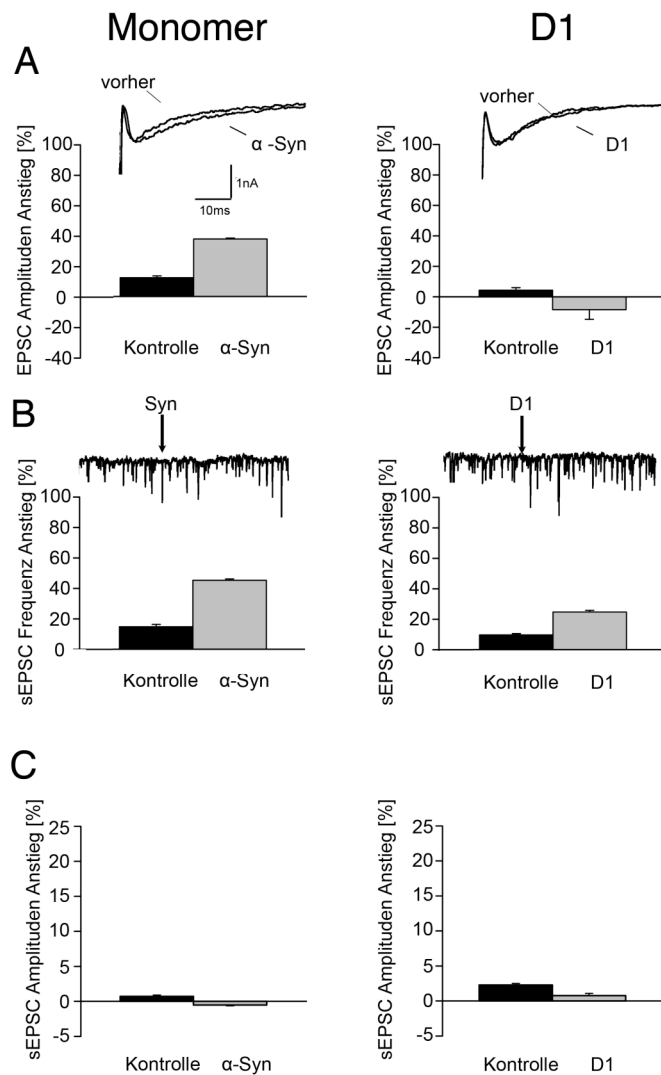


Abb. 27: Effekt der α -Synuclein-Präparationen auf die NMDA-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission.

A Effekt von zwei α -Synuclein-Präparationen (Monomer, D1; 100 nM) auf die Amplitude NMDA-Rezeptor-mediierter EPSCs.

B Effekt von zwei α -Synuclein-Präparationen (Monomer, D1; 100 nM) auf die Frequenz spontaner EPSCs (sEPSCs).

C Effekt von zwei α -Synuclein-Präparationen (Monomer, D1; 100 nM) auf die Amplitude der NMDA-Rezeptor-medierten spontanen EPSCs (sEPSCs).

Die Graphen zeigen die Effekte der Applikation von unterschiedlichen α -Synuclein-Präparationen im Vergleich zu den Effekten der korrespondierenden Lösungsmittelkontrollen in Prozent (* $p < 0,05$). Die Ableitungen in **A** und **B** zeigen jeweils repräsentative Messungen. Die Pfeile (\downarrow) unter **B** entsprechen dem Applikationszeitpunkt. Die Balken entsprechen den Mittelwerten von 10-15 Neuronen; Monomer (n=15), Oligomere D1 (n=13).

Tab. 13: EPSC und sEPSC der NMDA-Rezeptoren

NMDA Anstieg	EPSCs	sEPSC	
	Amplitude	Frequenz	Amplitude
Kontrolle	$2,88 \pm 0,75 \%$	$-10,70 \pm 1,12 \%$	$-4,27 \pm 18,35\%$
Monomer	$-2,07 \pm 0,51 \%$	$-32,82 \pm 0,57 \%$	$-8,48 \pm 2,84 \%$
Kontrolle	$7,98 \pm 0,73 \%$	$-77,01 \pm 0,69 \%$	$3,83 \pm 1,46 \%$
D1-Präparation	$2,69 \pm 1,11 \%$	$-17,90 \pm 0,72 \%$	$-7,24 \pm 5,54 \%$

Daten werden als Mittelwert dargestellt \pm SEM; n = 13 –24 Zellen pro Messung.

3.2.2 Kurzzeitplastizität

Zum Studium der synaptischen Übertragung an der exzitatorischen Synapse wurde der Mechanismus der Doppelpulsstimulation (engl. *paired pulse*, PP) als Parameter der Kurzzeitplastizität herangezogen. Er beschreibt die Amplitudenerhöhung oder -erniedrigung zweier kurz aufeinander folgenden evozierten EPSCs (Konnerth et al. 1990). Wie unter Kapitel 2.4.5.4 beschrieben, werden diese *paired pulse depression* und *paired pulse facilitation* genannt. Dieser Effekt ist jedoch auch von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_e$ abhängig. So führt eine Doppelpulsstimulation bei niedrigem extrazellulärem Ca^{2+} meist zur Faszilitierung (*Facilitation*) und bei hohem $[\text{Ca}^{2+}]_e$ zur *Depression* (Zucker 1989). Die Veränderung der synaptischen Antwort bei Stimulation, die nur Sekunden bis Minuten andauert, wird als Kurzzeitplastizität bezeichnet (Zucker and Regehr 2002).

In der Ausprägung der PPD und PPF konnte kein Unterschied zwischen monomerem α -Synuclein und den oligomeren α -Synuclein- Präparationen festgestellt werden (). Die Applikation der verschiedenen α -Synuclein-Oligomer-Präparationen hatte keinen signifikanten Effekt auf die Kurzzeitplastizität.

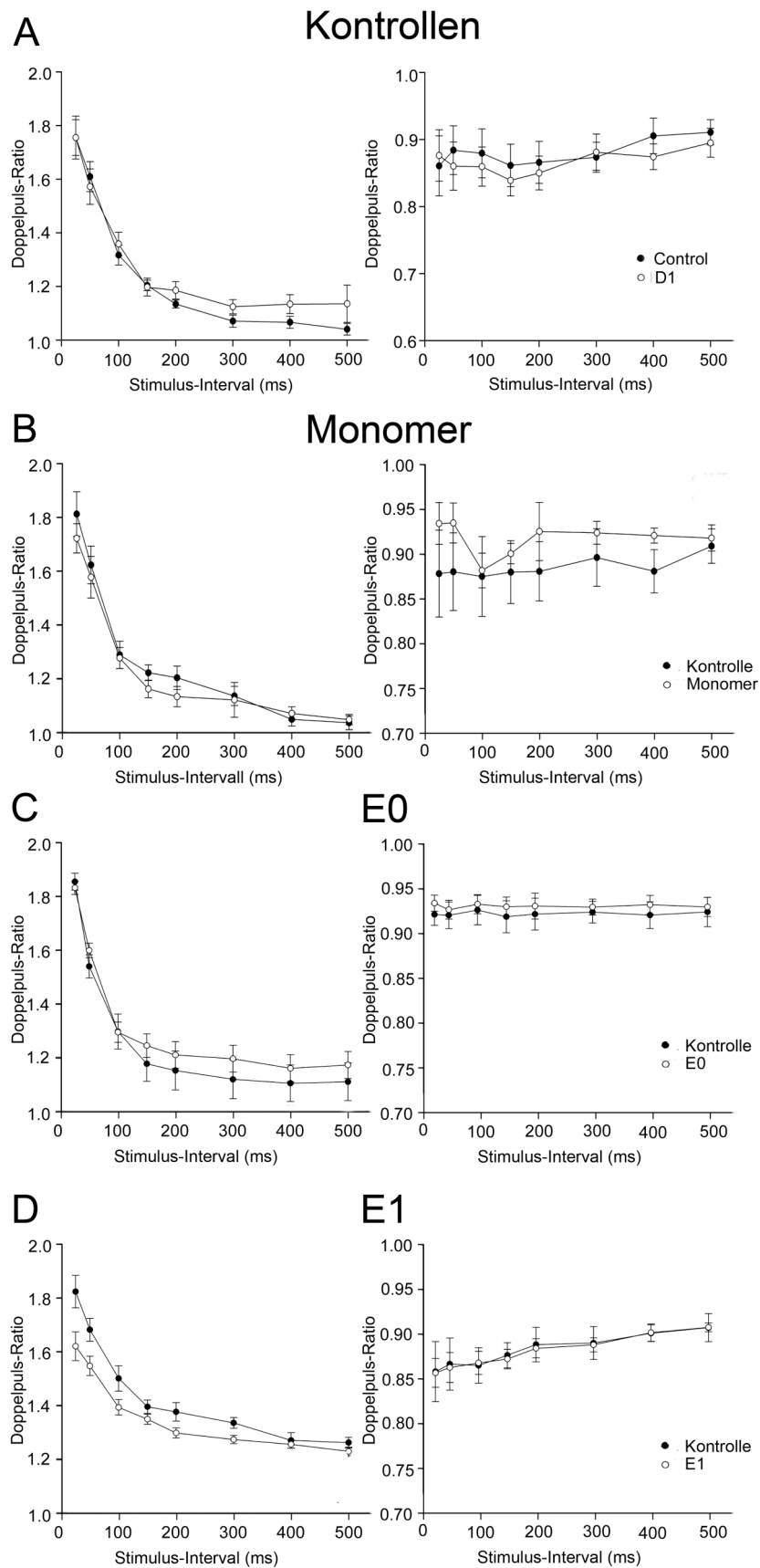


Abb. 28: Kurzzeitplastizität

Typischer Verlauf einer Doppelpulsstimulation von Neuronen nach Applikation von Kontroll-Präparationen und α -Synuclein-Oligomer-Präparationen.

Paired pulse facilitation bei 1 mM $[Ca^{2+}]_e$: der Graph beschreibt die Doppelpuls-Ratio (Verhältnis der Amplitude vom zweiten zum ersten EPSC) als Funktion von 8 unterschiedlichen Stimulus-Intervallen bei Neuronen, denen monomeres α -Synuclein ($n=12$) sowie α -Synuclein-Oligomer-Präparationen D1 ($n=13$), E0 ($n=14$) und E1 ($n=11$) appliziert wurden.

Paired pulse depression bei 4 mM $[Ca^{2+}]_e$: der Graph beschreibt die Doppelpuls-Ratio (Verhältnis der Amplitude vom zweiten zum ersten EPSC) als Funktion von 8 unterschiedlichen Stimulus-Intervallen bei Neuronen, denen monomeres α -Synuclein ($n=7$) sowie α -Synuclein-Oligomer-Präparationen D1 ($n=8$), E0 ($n=5$) und E1 ($n=5$) appliziert wurden.

3.3 Effekt der α -Synuclein-Oligomere auf den Kalzium-Haushalt

Die Erhöhung der AMPA-Rezeptor-vermittelten synaptischen Ströme nach Applikation von oligomeren α -Synuclein D1- und E1-Präparationen ist möglicherweise bedingt durch eine erhöhte präsynaptische Ca^{2+} -Konzentration. Die folgenden Untersuchungen sollten daher den Einfluss der verschiedenen Oligomer-Präparationen auf die zytosolische Ca^{2+} -Konzentration untermauern. So wurde beschrieben, dass bestimmte Oligomer-Präparationen Ca^{2+} -permeable Poren ausbilden (Kayed et al. 2004; Danzer et al. 2007; Tsigelny et al. 2007; Kostka et al. 2008). Andere Studien zeigten eine Anlagerung der α -Synuclein-Oligomere an einen spannungsaktivierten Ca^{2+} -Kanal (engl. *Voltage-gated calcium channel*, VGCC) (Beattie et al. 2000; Biou et al. 2008), die dessen Öffnung modulieren. Beide Mechanismen führen zu einem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen.

Um diesen zu messen, wurden Zellen und Synaptosomen mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff beladen und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration mittels Fluoreszenzänderung nachgewiesen. Da sowohl eine mögliche Porenbildung als auch eine Ionenkanalöffnung innerhalb von Millisekunden nach Applikation der α -Synuclein-Oligomer-Präparationen entstehen, wurden die Messungen mittels Echtzeitmessung analysiert (Kapitel 2.9).

3.3.1 Spines und Dendriten

Die synaptische Übertragung ist sowohl von prä- als auch von postsynaptischer Seite direkt Ca^{2+} -abhängig. Um die Ca^{2+} -Veränderungen an der Postsynapse zu untersuchen, wurden Neurone, die mit Fluo-4AM beladen waren, mit verschiedenen α -Synuclein-Präparationen (Monomere, Kontrollen und Oligomere D0 und D1) inkubiert. Gemessen wurde das intrazelluläre Ca^{2+} in Dendriten und Spines. Vergleicht man den prozentualen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg nach der Applikationen von monomerem α -Synuclein mit dem nach der D0-Oligomeren-Applikation, so kann kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Monomer: $8,99 \pm 0,93 \%$, $n=12$; D0: $12,13 \pm 1,23 \%$, $n=7$). Die Applikation von D1-

Oligomeren löste hingegen eine signifikante Ca^{2+} -Erhöhung aus ($\text{D1: } 19,3 \pm 3,25 \%$, $n=9$). Um zu untersuchen, ob sich der Ca^{2+} -Anstieg auf einen Ca^{2+} -Einstrom oder auf die Freisetzung des intrazellulären Ca^{2+} zurückführen lässt, wurden Kontroll-Präparationen, die kein extrazelluläres Ca^{2+} beinhalteten, untersucht. Diese zeigten keinerlei Veränderungen des Ca^{2+} -Haushaltes. So ist zu vermuten, dass die α -Synuclein-Oligomere entweder eine Ionenpermeabilität mittels Poreneinlagerung oder durch Öffnung von Ca^{2+} -permeablen Kanälen induzieren. In Abb. 29 werden repräsentative Messungen von Fluo-4AM-beladenen Neuronen gezeigt.

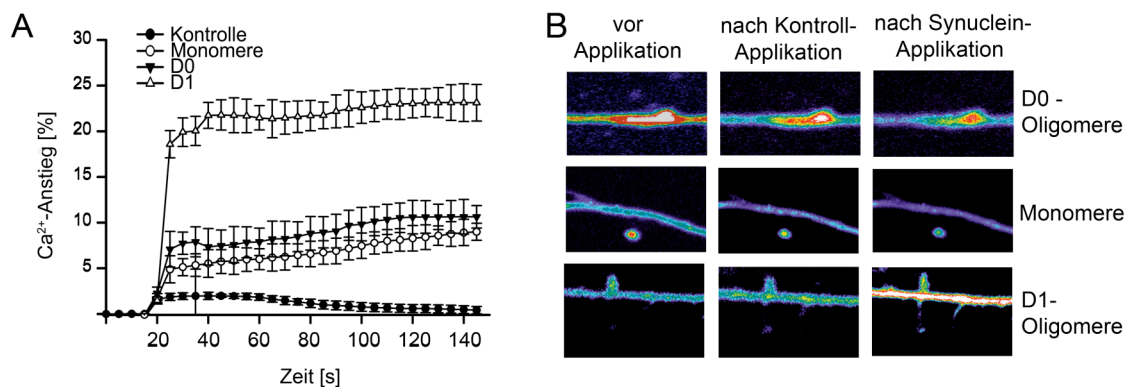


Abb. 29: Intrazelluläres Ca^{2+} in Dendriten unter extrazellulärer Applikation von α -Synuclein-Oligomer-Präparationen

A Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) \pm s.e.m. in Prozent der Signalstärke des Ca^{2+} -sensitiven Farbstoffes Fluo-4AM über die Zeit. Die Zugabe von monomerem α -Synuclein und den α -Synuclein-Präparationen erfolgte nach 20 sec. (Monomer $n=12$, Oligomere D0 $n=7$, D1 $n=9$)

B Repräsentative Bilder von Ca^{2+} -Indikator-gefüllten Dendriten vor und nach α -Synuclein-Applikation.

Alle Messungen wurden an Dendriten kortikaler Neurone auf Basis konfokaler Untersuchungen durchgeführt.

3.3.2 Synaptosomen

Ein wichtiger Punkt dieser Arbeit war, zu klären, auf welche Weise die extrazelluläre Applikation von α -Synuclein-Oligomeren die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration moduliert. Die Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen an Dendriten sollten nun an Synaptosomen-Präparationen verifiziert werden.

Synaptosomen wurden aus kortikalen Neuronen von FVB-Mäusen präpariert. Der Ca^{2+} -Einstrom wurde nach Applikation der α -Synuclein-Oligomer-Präparationen indirekt über die Glutamatfreisetzung detektiert (Abb. 30, A). Ein Vergleich der Messungen nach Applikation

von monomerem α -Synuclein und der D0-Oligomer-Präparation mit den Messungen nach D1-Oligomer-Applikation zeigte einen signifikant erhöhten Ca^{2+} -Einstrom (Monomer: $121,3 \pm 10,5$, $n=20$; D0: $125,8 \pm 12,9$, $n=20$; D1: $176,5 \pm 20,4$, $n=20$). Um den Ca^{2+} -Anstieg direkt in den Synaptosomen zu zeigen, wurden diese mit Fluo-4 beladen und anschließend die verschiedenen α -Synuclein-Oligomer-Präparationen appliziert (Abb. 30: Einfluss der α -Synuclein-Oligomere auf Synaptosomenpräparation, B). Es zeigte sich das gleiche Ergebnis wie bei der Glutamatfreisetzung, nämlich ein signifikanter Anstieg nach D1-Oligomer-Applikation (Monomer: $11,5 \pm 1,9$, $n=15$; D0: $9,3 \pm 1,1$, $n=15$; D1: $40,1 \pm 3,9$, $n=15$).

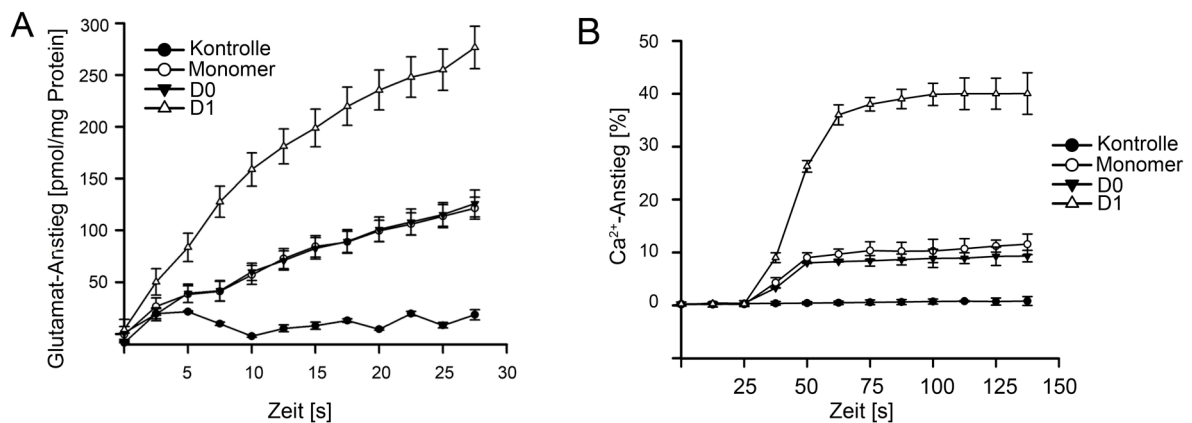


Abb. 30: Einfluss der α -Synuclein-Oligomere auf Synaptosomenpräparation

Synaptosomen, präpariert von 6 Wochen alten FvB-Mäusen, zeigen einen signifikanten Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration bei Zugabe von großen Fe^{3+} -induzierten α -Synuclein-Oligomeren zum einen indirekt über die Glutamatfreisetzung und zum anderen über direkte Ca^{2+} -Messungen. Diese Ergebnisse wurden über zwei verschiedene Methoden ermittelt. Es wurden 5 Synaptosomen-Präparationen untersucht (Monomer: $n=20$; D0: $n=20$; D1: $n=20$).

A zeigt die Glutamatfreisetzung nach Applikation von α -Synuclein-Präparationen

B zeigt mittels Fluo-4AM somatische Ca^{2+} -Veränderungen nach Applikation von α -Synuclein-Präparationen (Monomer: $n=15$; D0: $n=15$; D1: $n=15$)

3.4 Rezeptorendichte

Um zu untersuchen, ob der Erhöhung der AMPA-Rezeptor-vermittelten synaptischen Transmission eine verstärkte Einlagerung von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran zugrunde liegt, wurden akute Hirnschnitte 1 h mit 100 nM D1-Oligomeren oder der zugehörigen Lösungsmittelkontrolle inkubiert und anschließend wurde die AMPA- bzw. NMDA-Rezeptor-Dichte in der postsynaptischen Membran untersucht. Beim Vergleich der relativen Proteinspiegel von AMPA-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren konnte nur eine signifikante Erhöhung der AMPA-Rezeptoren festgestellt werden (Abb. 31:).

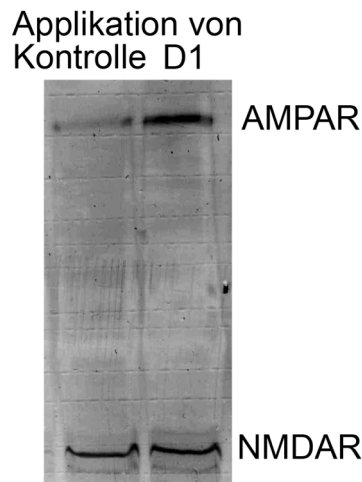


Abb. 31: Proteinlevel von AMPA-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren

WesternBlot-Analyse des Lysats mit Kontroll und D1-Oligomeren. Es wurde mittels einer Biotinylierung der Oberflächenproteine und deren Aufreinigung die Menge inserierter AMPA-Rezeptoren bzw. NMDA-Rezeptoren untersucht.

3.5 Toxizität und Exzitotoxizität

Nachdem gezeigt werden konnte, dass D1-Oligomere spezifisch die AMPA-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission verstärken, sollte dessen pathophysiologische Relevanz untersucht werden. Aus diesem Grund wurden primäre kortikale Neurone monomerem α -Synuclein und den D0- oder D1-Präparationen für 5 Tage ausgesetzt. Die neuronale Überlebenswahrscheinlichkeit wurde durch Verwendung des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Assays (MTT-Assay) gemessen. Wie in Abb. 32, A gezeigt, führte die Applikation von D1-Oligomeren zu einer signifikant erhöhten Glutamat-Exzitotoxizität, welche schon nach 1 Stunde Inkubation sichtbar wurde. Dahingegen waren 10 μ M Glutamat unter denselben Bedingen nicht toxisch für Neuronen unter Applikation von monomerem α -Synuclein und D0-Oligomer-Präparationen (Abb. 32, B). Es besteht ein Dosis-Wirkungsverhältnis zwischen der Glutamatkonzentration (5–100 μ M) und der Toxizität der D1-Oligomer-Präparationen (Abb. 32, C).

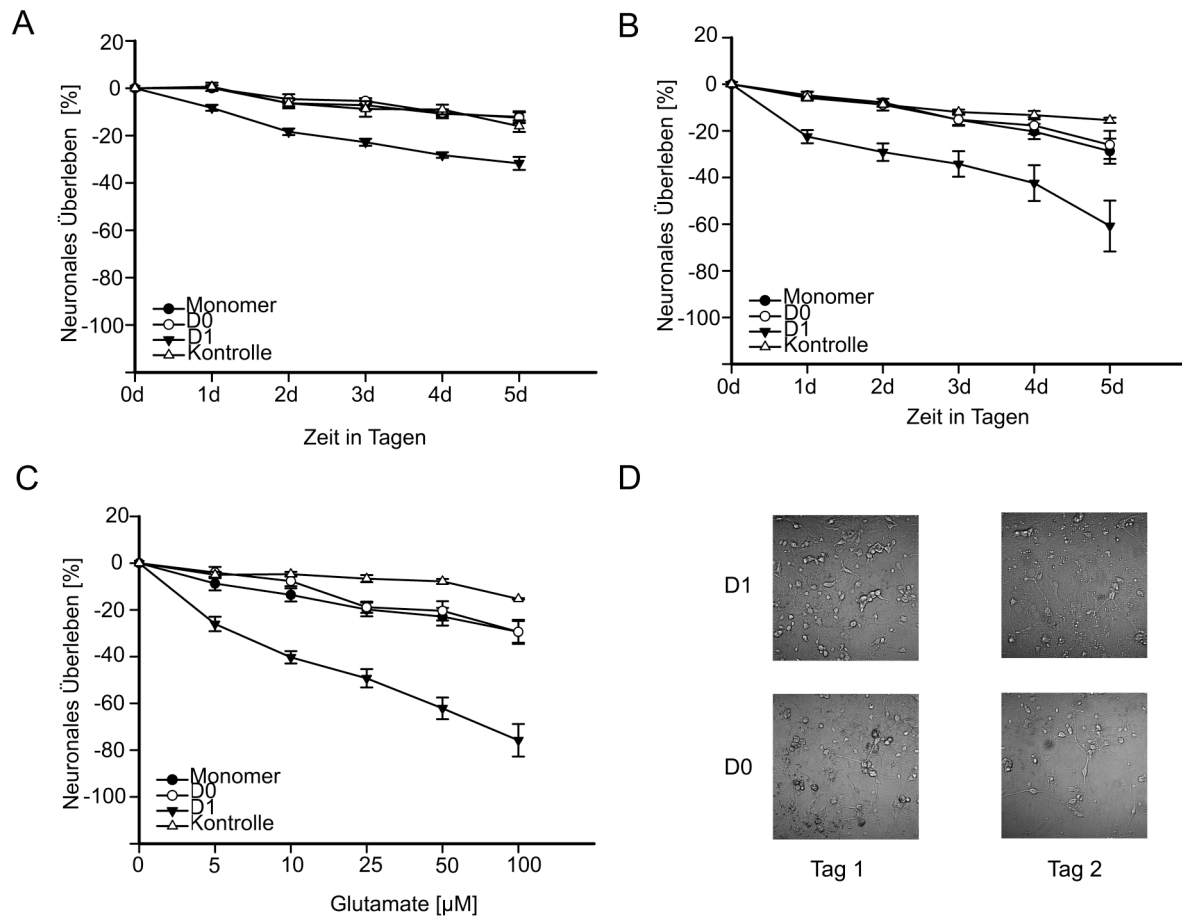


Abb. 32: Zytotoxischer Effekt der D1-Oligomer-Präparation in primären Neuronenkulturen

Kortikale Neurone von Wildtyp-Mäusen (FvB) wurden mit der organischen Lösungsmittel-Kontrolle α -Synuclein-Monomeren und D1-Oligomeren in serum-freiem NBA-Medium inkubiert. Die neuronale Überlebensfähigkeit wurde durch Zählen der apoptotischen Zellen mittels eines 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (*MTT*) Assays untersucht. Die Ergebnisse wurden im Verhältnis zu den Mittelwerten \pm s.e.m. in drei voneinander unabhängigen Messungen ermittelt.

A Überlebenswahrscheinlichkeit von kortikalen Neuronen über fünf Tage unter Zugabe von Lösungsmittelkontrolle, dem α -Synuclein-Monomer und den Oligomeren D0 und D1(jeweils 100 nM).

B Überlebenswahrscheinlichkeit von kortikalen Neuronen über fünf Tage in Anwesenheit von 10 μ M Glutamat unter Zugabe von Lösungsmittelkontrolle, dem α -Synuclein-Monomer und den Oligomeren D0 und D1(jeweils 100 nM).

C Überlebenswahrscheinlichkeit von kortikalen Neuronen nach 6 Stunden in Anwesenheit von 5-100 μ M Glutamat unter Zugabe von Lösungsmittelkontrolle, dem α -Synuclein-Monomer und den Oligomeren D0 und D1(jeweils 100 nM).

D Bilder zeigen repräsentative kortikale Neurone (Tag 18 in Kultur) nach Behandlung mit D1- oder D0-Oligomer-Präparationen (100 nM) für 1 bis 5 Tage.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von unterschiedlichen α -Synuclein-Oligomer-Präparationen auf die exzitatorische synaptische Übertragung untersucht werden.

Die Diskussion der Ergebnisse gliedert sich in vier Teile. Zu Beginn werden die Ergebnisse zur unterschiedlichen Beschaffenheit der untersuchten α -Synuclein-Oligomer-Präparationen erörtert. Anschließend erfolgt eine Diskussion über den Effekt der Akutapplikation unterschiedlicher α -Synuclein-Oligomer-Präparationen auf die synaptische Transmission. Außerdem werden die dafür möglicherweise ursächlichen Mechanismen dargelegt. Im vorletzten Abschnitt werden Veränderungen im neuronalen Ca^{2+} -Haushalt von Neuronen und deren pathophysiologische Relevanz für die Zyto- bzw. Exzitotoxizität von bestimmten α -Synuclein-Oligomer-Präparationen betrachtet. Zusammenfassend werden im letzten Teil die Relevanz der in dieser Doktorarbeit erhobenen Befunde für das Verständnis der Pathophysiologie der Synucleinopathien und die sich daraus ableitenden möglichen neuen Therapieformen diskutiert.

4.1 Aggregationsverhalten von α -Synuclein

In der vorliegenden Arbeit wurden Oligomere aus humanen α -Synuclein-Monomeren präpariert. Es konnten sowohl bei immunhistochemischen Untersuchungen als auch bei SIFT- und FIDA-Untersuchungen die reinen α -Synuclein-Monomere deutlich von den oligomeren Mischaggregatspezies unterschieden werden. Veränderungen der α -Synuclein-Monomer-Präparationsbedingungen, etwa die Gegenwart von organischen Lösungsmitteln (z.B. DMSO oder Ethanol), führten zu einer Aggregationsinduktion und damit zur Bildung von Oligomeren. Hierbei bildete sich eine α -Synuclein-Oligomerstruktur, die alle Formen von α -Synuclein-Dimeren bis hin zu kleinen Oligomeren (30-80mere, D0 und E0) beinhaltete (siehe Kapitel 3.1). Zusätzliche Fe^{3+} -Ionen erhöhten das Aggregationspotential nochmals und führten zur Formierung einer Mischspezies von α -Synuclein-Dimeren und -Oligomeren bis hin zu 120meren (sie wurden als D1 und E1 bezeichnet).

Wie Koo et al. (1999) feststellten, gehörte die Bildung β -faltblattreicher Strukturen sowie die Proteinaggregation zu den molekularen Schlüsselereignissen neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson. Bisher wurde aber nur unzureichend geklärt, welche α -Synuclein-Aggregate die toxische Spezies darstellen (Smith et al. 1985).

Analog zu vorangegangenen Aggregationsstudien zeigte sich auch in dieser Arbeit das

geringe Aggregationsverhalten des α -Synucleins bei niedrigen Proteinkonzentrationen. Verschiedentlich wurde betont, dass der Einsatz von Lösungsmitteln, wie Ethanol oder DMSO, zur Aggregationsinduktion des α -Synucleins verwendet werden kann (Munishkina et al. 2004). Erstmalig erkannten Munishkina et al. (2003) die damit einhergehende Ähnlichkeit mit hydrophoben Bereichen von Biomembranoberflächen und die daraus folgende Herabsetzung der dielektrischen Konstante. Aufgrund dessen wurden auch in der vorliegenden Studie organische Lösungsmittel, wie DMSO und EtOH, verwendet. Dabei bestätigten sich die Befunde von Munishkina, Danzer und Högen, dass α -Synuclein-Monomere sich in Gegenwart von organischem Lösungsmittel auch bei physiologischen Konzentrationen zu kleinen Oligomeren (30-80mere) zusammenlagern können (siehe Kapitel 3.1.1).

Nach den Untersuchungen von Rhodes et al. (2008) und Syder et al. (2009) wurden bei MP vorwiegend Neurone in Bereichen mit einem hohen Fe^{3+} -Gehalt, wie der *Substantia nigra*, befallen. Auch ist durch Beiträge aus der Aggregationsforschung bekannt, dass Metallionen, wie Fe^{3+} -Ionen, die Bildung großer oligomerer Aggregatspezies fördern (Uversky et al. 2001; Cole et al. 2005; Högen et al. 2012; Schmidt et al. 2012). In Einklang mit diesen Ergebnissen wiesen die hier *in vitro* präparierten Oligomere mit Fe^{3+} große Ähnlichkeiten mit α -Synuclein-Oligomeren aus dem Gehirn von Parkinson-Patienten auf (Tsigelny et al. 2007). Auch sie bestanden aus einer oligomeren Mischspezies.

Es konnten sowohl detergensresistente α -Synuclein-Oligomere (Kahle et al. 2002; Sharon et al. 2003) als auch oligomerere Aggregatspezies mit einer ringförmigen Struktur (Pountney et al. 2004) aus humanem zentralnervösem Gewebe von Patienten mit Morbus Parkinson und aus transgenen Tiermodellen isoliert werden. Durch diese verschiedenen α -Synuclein-Oligomerarten konnte die Wichtigkeit der Fe^{3+} -induzierten α -Synuclein-Oligomere untermauert werden.

In der vorliegenden Studie zeigte sich deutlich, dass die reine Zugabe von organischen Lösungsmitteln die Aggregation zwar induzierte, sich aber größere, stabile Aggregate erst nach zusätzlicher Fe^{3+} -Applikation bildeten. Erst diese Oligomere (D1 und E1) schienen ein Modellsystem für die Aggregationsprozesse im Gehirn bei Synucleopathiepatienten zu sein.

Die Vermutung liegt nahe, dass α -Synuclein-Oligomere die Permeabilität der Membranen erhöhen und damit eine Ionenpermeabilität induzieren. Die Bildung von Poren bzw. die Permeabilisierung von zellulären Lipidmembranen sowie die Schädigung von Zellorganellen wurden in vorangegangenen Studien als möglicher toxischer Wirkungsmechanismus der oligomeren Proteinaggregate diskutiert (Volles and Lansbury 2002; Kaye and Glabe 2006;

Lashuel and Lansbury 2006; Haass and Selkoe 2007; Tsigelny et al. 2007; Schmidt et al. 2012; Tosatto et al. 2012).

Danzer et al. zeigten 2007, dass α -Synuclein-Oligomere, die nach dem gleichen Protokoll wie in dieser Arbeit mit Lösungsmitteln und Fe^{3+} präpariert wurden, bei millimolaren Konzentrationen zur Porenbildung in Zellmembranen führten (Kayed et al. 2004; Danzer et al. 2007; Tsigelny et al. 2007; Kostka et al. 2008; Schmidt et al. 2012). Daher kann vermutet werden, dass diese Form der Oligomere die toxische Spezies darstellt. Dies stützt die Hypothese, dass Metallionen die Formation von α -Synuclein-Aggregaten und damit den Verlauf des Morbus Parkinson bedeutend beeinflussen.

Abschließend konnten in den Untersuchungen der α -Synuclein-Oligomer-Präparationen die unterschiedlichen Größen und Beschaffenheiten der Oligomere festgestellt werden. Hier konnte auch bei Verwendung von nanomolaren α -Synuclein-Konzentrationen die Bildung von Oligomeren, ähnlich wie sie bei Morbus Parkinson Patienten vorkommen, gezeigt werden.

4.2 Einfluss der Oligomere auf die synaptische Übertragung

Die wahrscheinliche Beteiligung von α -Synuclein-Oligomeren an der synaptischen Transmission wirft die Frage auf, durch welche α -Synuclein-Oligomerspezies diese mediert wird. In den elektrophysiologischen Untersuchungen dieser Studie an kultivierten autaptischen Hippokampus-Neuronen von FvB-Wildtyp-Mäusen konnte nach externer Applikation von großen α -Synuclein-Aggregaten (ca. 120mere, D1 und E1) eine selektiv gesteigerte AMPA-Rezeptor-vermittelte synaptische Übertragung beobachtet werden. Sowohl die Amplitude stimulierter EPSCs als auch die Frequenz spontaner EPSCs waren erhöht. Dagegen wurde keine Beeinflussung NMDA-Rezeptor-vermittelter synaptischer Ströme beobachtet. Die Modulation der über den AMPA-Rezeptor-vermittelten synaptischen Übertragung durch große α -Synuclein-Aggregate erfolgt somit sehr wahrscheinlich über pre- und postsynaptische Mechanismen.

Weder bei der Applikation von Monomeren noch bei der Zugabe von kleinen α -Synuclein-Oligomeren (30-80mere, E0) konnte eine Veränderung stimulierter AMPA-Rezeptor-vermittelter EPSCs oder der Spontanaktivität von AMPA-Rezeptor-vermittelten synaptischen Strömen beobachtet werden. Keine der untersuchten Monomere oder Oligomere beeinflussten die Kurzzeitplastizität von AMPA-Rezeptor- oder NMDA-Rezeptor-medierten synaptischen Strömen.

Als nächstes gilt es zu diskutieren, wie und ob Störungen der AMPA-Rezeptor-vermittelten synaptischen Übertragung mit den Zellschäden bei Synucleinopathien in Zusammenhang stehen. In der Vergangenheit sind unterschiedliche Wege einer Schädigung der Zellfunktion durch α -Synuclein-Oligomere beschrieben worden, die im Weiteren ausführlich dargestellt und diskutiert werden: Neben den Effekten auf die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Bucciantini et al. 2002), wurden eine Schädigung der mitochondrialen Funktion, die Aktivierung von Ca^{2+} -permeablen Oberflächenrezeptoren (Martin et al. 2006) und die Ausbildung von kationenleitenden Poren in Zellorganellen und/oder in der Plasmamembran (Kayed et al. 2004) durch α -Synuclein-Oligomere beschrieben. Sie alle können den Zelltod zur Folge haben (Bucciantini et al. 2004).

Die durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelösten Schädigungen können über verschiedene Mechanismen erfolgen.

Zum einen könnte ein Mechanismus über die hier verwendeten Fe^{3+} -Ionen ausgelöst werden. Es wurde vermutet, dass eine Metallionenerhöhung über physiologisches Niveau maßgeblich an der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und freien Radikalen beteiligt ist. Diese können zu oxidativem Stress führen und durch pathologische Aggregationsprozesse einen zellulären Schaden induzieren (Zecca et al. 2004). Im Gegensatz dazu lag die in dieser Arbeit verwendete Fe^{3+} -Konzentration im physiologischen Normbereich, sodass die Bildung von ROS ausgeschlossen werden konnte.

Zum anderen konnte pharmakologisch ausgelöstes Parkinson durch oxidativen Stress nach MPTP-Gabe nachgewiesen werden. Dabei entstanden reaktive Sauerstoffspezies durch die inhibierende Wirkung von MPP^+ (1-Methyl-4-phenylpyridinium), dem aktiven MPTP-Metaboliten, auf die mitochondriale NADH-Dehydrogenase und die intrazelluläre Oxidation von Dopamin (Chan et al. 1991; Lotharius und O'Malley 2000; Lotharius et al. 1999; Nicklas et al. 1985; Ramsay et al. 1986; Ramsay et al. 1991).

So ist unter Berücksichtigung der hier verwendeten weitaus geringeren Fe^{3+} -Konzentration eine Bildung von ROS eher unwahrscheinlich.

Eine mitochondriale Dysfunktion kann durch α -Synuclein und dessen Oligomere hervorgerufen werden. Eine Inkubation mit ihnen verursachte verschiedene Veränderungen in den Mitochondrien, wie in der Zusammenfassung von (Nakamura) (2013) dargelegt. Diese Veränderungen führen zu toxischen Effekten, wie die Akkumulation von α -Synuclein in Mitochondrien, eine Verkürzung der Mitochondrien oder auch die Veränderung der physiologischen Prozesse. Die Untersuchung der Mitochondrien war jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit. Deshalb ist nicht auszuschließen, dass die sich hier zeigte

Neuronenschädigung über eine mitochondriale Dysfunktion erklären lässt. Diese würde jedoch keine Erhöhung der synaptischen Transmission hervorrufen, wie sie hier beobachtet werden konnte. Daher ist die mitochondriale Dysfunktion als zentraler Wirkmechanismus eher unwahrscheinlich.

Der Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} lässt sich sowohl über die Aktivierung der Oberflächenrezeptoren als auch über die Ausbildung von ionenpermeablen Poren durch α -Synuclein-Oligomere erklären.

Die Aktivierung der Oberflächenrezeptoren bei Matrin et al. (2011) erfolgte durch eine externe Applikation von α -Synuclein-Oligomeren, die eine Erhöhung des intrazellulären Kalziums zur Folge hatte. Die damit einhergehende Aktivierung des Calcineurin und die Erniedrigung der transkriptionellen Aktivität des *camp-response element-binding protein* (CREB) führten zu einem Calcineurin-vermittelten Tod von humanen Neuroblastenzellen. Der nachgewiesene Ca^{2+} -Anstieg ließe sich auch über diesen Mechanismus erklären. Auch hier war nicht davon auszugehen, dass dies der zentrale Mechanismus war. Der untersuchte schnelle Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} lässt sich nicht alleine über die Calcineurinaktivierung erklären, sodass von einem weiteren, zumindest parallelen Mechanismus ausgegangen werden konnte.

Es wird angenommen, dass die Bildung ionenpermeabler Poren ein zentraler Mechanismus in der Neuronenschädigung bei MP ist. Bei der Verwendung von Oligomerpräparationen, die wie in dieser Arbeit mit Lösungsmittel und Fe^{3+} induziert wurden (D1 und E1, Kapitel 3.1.1), konnte eine Porenbildung mehrfach in Studien mit Lipid-Doppelmembranen nachgewiesen werden (Kayed et al. 2004; Danzer et al. 2007; Tsigelny et al. 2007; Kostka et al. 2008). Es ist daher anzunehmen, dass der Anstieg von Ca^{2+} , der in dem von uns gewählten Versuchsaufbau durch die Insertion von α -Synuclein-Poren induziert wurde, das primäre toxische Ereignis bei einem Neuronenverlust ist.

Der gezeigte Anstieg von Ca^{2+} in der Prä- und Postsynapse ist somit als Ursache für die vorliegenden Befunde der erhöhten AMPA-Rezeptor-induzierten Ströme anzunehmen. Diese wurden durch α -Synuclein-Oligomere, D1 und E, ausgelöst.

Eine Verstärkung des Ca^{2+} -Anstiegs wird über einen positiven Feedbackmechanismus ausgelöst, der die an sich schon hohe Ca^{2+} -Konzentration durch einen zusätzlichen Ca^{2+} -Einstrom mittels spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (engl. *voltage gated calcium channels*, VGCC) nochmals erhöht. Dadurch wird die Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in der Postsynapse nochmals angehoben. Mittels bildgebender Methoden konnte die Erhöhung von

intrazellulären Ca^{2+} [Ca^{2+}]_i gezeigt werden (Kapitel 3.3).

Die Verstärkung der AMPA-Rezeptor-vermittelten EPSCs könnte durch eine Insertion von AMPA-Rezeptoren in der postsynaptische Membran begründet sein. In einer Studie von Diogenes (2012) konnte dieses bei elektrophysiologischen Untersuchungen gezeigt werden. Sie behandelten im Gegensatz zu der vorliegenden Studie nicht Neurone sondern Hirnschnitte mit α -Synuclein-Oligomer-Präparationen (Diogenes et al. 2012). Nach den Ausführungen von Beattie et al. (2000) und Biou et al. (2008) wirkte die Insertion der AMPA-Rezeptoren als ein kritischer Mechanismus. Diesem lag eine Hemmung der synaptischen Wirksamkeit zugrunde wie z.B. die Langzeitdepression, welche schließlich zum dendritischen *Spine*-Verlust führte (Beattie et al. 2000; Biou et al. 2008). Diese Ergebnisse könnten ausschlaggebend für die hier gezeigten Veränderungen in der synaptischen Transmission sein. Der dendritische Spine-Verlust konnte sowohl in der Pathophysiologie bei Patienten mit LB (Kramer and Schulz-Schaeffer 2007) als auch durch den Einfluss des Fe^{3+} und der Mitochondrien in MP belegt werden (Arima et al. 1998).

Vor dem Hintergrund der gezeigten Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration sowie der Erhöhung der AMPA-Rezeptor-medierten Ströme erscheint es zunächst ungewöhnlich, dass keine Änderungen der NMDA-Rezeptor-medierten Ströme gemessen werden konnten. Hierbei bleibt zu beachten, dass die Oberflächenexpressionen von AMPA-Rezeptoren und NMDA-Rezeptoren zeitliche Unterschiede aufweisen.

Diogenes et al. (2012) zeigten, dass die Oberflächenexpression und Endozytose von AMPA-Rezeptoren nach einem intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg innerhalb weniger Minuten reguliert wird, während Snyder et al. (2009) feststellten, dass diese Oberflächenexpression und Endozytose von NMDA-Rezeptoren erst innerhalb von Stunden geschehen. Daher konnten in dieser Arbeit nach Akutapplikation von α -Synuclein-Oligomeren nur die Ergebnisse einer AMPA-Rezeptorexpression gemessen werden. In diesem Zusammenhang wäre es wichtig, zu untersuchen, ob eine Langzeitinkubation von α -Synuclein-Oligomeren zu einer Insertionen von NMDA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran führt. Diese mittlerweile bereits von Diogenes durchgeführte Studie an Hippokampusschnitten stützt diese Vermutung und zeigt den Einbau von NMDA-Rezeptoren nach längerer Inkubation mit α -Synuclein-Oligomeren (Diogenes et al. 2012).

Ursprünglich wurde angenommen, dass die Erhöhung der AMPA-Rezeptor-vermittelten Ströme mit der Erhöhung der Kurzzeitplastizität einhergeht. Entgegen dieser Annahme wurden in der vorliegenden Arbeit keine Veränderungen der Kurzzeitplastizität gemessen (Kapitel 3.2.2). Damit reiht sich dieses Resultat in eine Vielzahl von sich widersprechenden

vorangegangenen Forschungsbefunden ein. Die Studienlage ist charakterisiert durch unterschiedlichste Untersuchungen, die sowohl im Methodenspektrum als auch in den untersuchten Hirnbereichen variieren.

Beispielsweise belegten eine Reihe von *in vitro* und *in vivo* Studien, dass bei α -Synuclein-Knockoutmodellen und Überexpressionsmodellen die Kurzzeitplastizität eine Veränderung aufweist (Cheng et al. 2011). Verschiedentlich wurde der Einfluss von α -Synuclein-Aggregaten auf die synaptische Plastizität von zerebralen Funktionseinheiten, wie den *nigrostriatalen* und *cortikostriatalen* Verknüpfungen sowie im Bereich des Hippokampus untersucht (Abeliovich et al. 2000; Steidl et al. 2003; Gureviciene et al. 2007; Watson et al. 2009). Hier zeigte sich zum einen eine Doppelpulsverstärkung der synaptischen Kurzzeitplastizität bei *cortikostriatalen* Hirnschnitten von α -Synuclein-Knockout und Überexpressionsmausmodellen in der *dorsolateralen* Region im *Striatum* (Watson et al. 2009). Diese konnte nur bei erhöhten Mengen humanen α -Synucleins nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte eine Doppelpulserniedrigung oder reduzierte Doppelpulsverstärkung im *Dentate gyrus perforat* Pfad oder im Moosfaser-CA3-Pfad im Hippokampus von transgenen Mäusen nachgewiesen werden. Diese Mäuse überexprimierten A30P- α -Synuclein oder humanes α -Synuclein (Steidl et al. 2003; Gureviciene et al. 2007).

Die inkonsistenten Ergebnisse, die durch die Effekte des α -Synucleins auf die Kurzzeitplastizität entstehen, können den unterschiedlichen Versuchsanordnungen und den untersuchten Gehirnregionen zugeschrieben werden.

Ein umstrittener Punkt in der vorliegenden Studie ist die Applikation der α -Synuclein-Oligomere von außen. Es ist zu berücksichtigen, dass α -Synuclein ein intrazelluläres synaptisches Protein ist. Jedoch konnte α -Synuclein vermehrt im extrazellulären Medium nachgewiesen werden. So zeigte Lee (2010) in *in vitro* Studien die Abgabe von α -Synuclein durch lebende Neurone in das extrazelluläre Medium. Auch bei MP-Patienten konnten α -Synuclein-Aggregate nicht nur intrazellulär sondern auch extrazellulär nachgewiesen werden, was auf eine mögliche Exozytose und den Austausch zwischen den Neuronen hindeutet (Lee et al. 2005). So wurden α -Synuclein-Oligomere sowohl im ZNS als auch im Plasma von MP-Patienten nachgewiesen (El-Agnaf et al. 2006; Mollenhauer et al. 2006). Desplats et al. zeigten 2009 die interneurale Verbreitung der α -Synuclein-Aggregate bei Neuronen mit einer α -Synuclein-Überexpression sowohl in Kultur als auch in transgenen Tieren (Desplats et al. 2009). Weiterhin zeigte sich eine heterogene Population von α -Synuclein-Oligomeren im extrazellulären Medium von neuronalen Kulturen (Lee et al. 2005; Li et al. 2008; Hansen et al. 2011). Danzer et al. 2007 vermuteten, dass diese extrazellulären Oligomere aufgenommen

und in retrograder Weise zum neuronalen Soma transportiert werden und dort neurotoxisch wirken (Danzer et al. 2007). Die vorliegende Studie zeigte auch eine Neurotoxizität durch extrazelluläre α -Synuclein-Oligomere. Desweiteren weist die Erhöhung der Transmission große Ähnlichkeiten mit denen bei MP-Patienten auf. Daher ist zu vermuten, dass nicht nur intrazelluläres α -Synuclein sondern auch extrazelluläres einen Einfluss auf den MP-Verlauf hat.

4.3 Veränderungen des Ionenhaushalts und der Neurotoxizität

In der vorliegenden Arbeit wurde die Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration an Dendriten und Synaptosomen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Lösungsmittel- und Fe^{3+} -präparierten α -Synuclein-Aggregaten einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} in Dendriten induziert (Kapitel 3.3.1, Abb. 29). Auch in Synaptosomen wurde nach Applikation eiseninduzierter α -Synuclein-Oligomere (D1) eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} sowie der Vesikelfreisetzung festgestellt (Kapitel 3.3.2, Abb. 30). Diese Störungen der Ca^{2+} -Homöostase in der Prä- und Postsynapse stützen die in Kapitel 4.2 diskutierten Veränderungen der synaptischen Transmission von AMPA-Rezeptor-induzierten Strömen. Nur die großen Oligomere (D1 und E1) zeigten in dieser Studie einen ähnlichen toxischen Effekt wie α -Synuclein-Oligomere in MP-Patientengehirnen. Für diese großen eiseninduzierten α -Synuclein-Oligomere konnte die Toxizität und Glutamat-Exzitotoxizität mittels eines MTT-Assays gezeigt werden (Kapitel 3.5, Abb. 32). Kleine Oligomere, D0 und E0, sowie Monomere zeigten nur einen geringen Vitalitätsverlust, der evtl. durch die erhöhte Konzentration des zugefügten α -Synucleins hervorgerufen wurde.

In vorangegangenen Studien wurde vielfach eine Erhöhung des Ca^{2+} nachgewiesen. Dabei wurden verschiedene Mechanismen diskutiert, die für den intrazellulären Kalzium-Anstieg durch verschiedene amyloide Proteine verantwortlich sein könnten: die erhöhte Permeabilität der Zellmembran (Demuro et al. 2005) kann einerseits durch den Einbau von Oligomer-Poren in die Zellmembranen (Arima et al. 1998; Lashuel et al. 2002), andererseits über eine Destabilisierung der Membranstruktur durch direkte Interaktion der Oligomere mit Membrankomponenten hervorgerufen werden (Smith et al. 1985; Colton et al. 1997).

Obwohl eine erhöhte Membranpermeabilität oder ein membrandestabilisierender Mechanismus durch Bindung an Membrankomponenten nicht ausgeschlossen werden kann, deuten vorangegangene Arbeiten auf Einbau von Oligomer-Poren hin. Unterschiedliche Arbeitsgruppen konnten unter Verwendung von synthetischen Lipiddoppelmembranen bei

Fe³⁺-präparierten α -Synuclein-Oligomeren die Bildung von Poren zeigen (Danzer et al. 2007; Tsigelny et al. 2007; Schmidt et al. 2012). Früh postulierten Goldberg und Lansbury, dass ringförmige Protofibrillen die toxische Spezies innerhalb des pathologischen Aggregationsprozesses bei Morbus Parkinson sind (Goldberg and Lansbury 2000). Unterstützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen an zentralnervösem Gewebe von Patienten mit PD und in transgenen Tiermodellen, die α -Synuclein überexprimieren. Hier wurden α -Synuclein-Oligomere (Sharon et al. 2003) und oligomere ringförmige Aggregate (Pountney et al. 2004) isoliert, welche eine Permeabilisierung der Membranen induzierten. Diese Forschungsbefunde unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, welche einen Anstieg des Ca²⁺ durch den Einbau von α -Synuclein-Poren postuliert.

Ein weiteres wichtiges Ergebnis dieser Arbeit war die gezeigte Glutamat-Exzitotoxizität. Dies ist ein toxischer Prozess, bei dem Neuronen durch Übererregung von Glutamat-Rezeptoren geschädigt werden. In Studien von (Beal 1998) und (Jenner and Olanow 2006) wurde dieser Prozess als ein potenzieller Mechanismus für den Verlust dopaminerger Neurone bei Morbus Parkinson beschrieben (Dexter et al. 1989; Kaur et al. 2003). Hierbei ist die Stabilität der dendritischen Spines sowohl von der Ca²⁺-Homöostase im postsynaptischen Kompartement als auch von der mitochondrialen Aktivität stark abhängig.

Eine Veränderung der Mitochondrienaktivität wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, aber vorangegangene Studien belegen deren Vorkommen bei MP-Fällen. So zeigten Hatano et al. (2009) eine reduzierte mitochondriale Funktion in einigen familiären MP-Fällen (Hatano et al. 2009), welche eine chronische Erhöhung der zytosolischen Ca²⁺-Konzentration aufwiesen. Diese wird durch α -Synuclein-Membranporen verstärkt und erhöht die exzitatorischen synaptischen Transmissionen. Daher kann vermutet werden, dass α -Synuclein-Oligomere durch die Interaktion mit der inneren Membranseite und der Mitochondrienmembranaussenseite Ca²⁺-permeable Poren bilden.

Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, dass große α -Synuclein-Aggregate, die mittels organischem Lösungsmittel und Eisen gebildet wurden, selektiv die AMPA-Rezeptor-vermittelte synaptische Transmission durch prä- und postsynaptische Mechanismen beeinflussen. Die vergrößerten exzitatorischen synaptischen Ströme könnten die intrazelluläre Ca²⁺-Dishomöostase durch Bildung Ca²⁺-permeabler Poren verstärken, was endgültig zu einem Synapsenverlust und neuronalem Zelltod in Synucleinopathien führt. Die Vermutung, dass α -Synuclein-Oligomere eine toxische Spezies sind, lässt sich eindeutig anhand dieser Befunde untermauern (Kapitel 3.5, Abb. 32).

4.4 Implikation der Studienergebnisse für die Therapie von Synucleinopathien

Neurologische Erkrankungen, die Einschlusskörperchen von α -Synuclein aufweisen, sogenannte Lewy-Körperchen (LK), werden unter dem Oberbegriff der Synucleopathien zusammengefasst. Sie treten in verschiedenen Hirnarealen bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Demenz mit Lewy-Körperchen, Neuroaxonale Dystrophie (NAD) und Varianten des Morbus Alzheimer auf. Zu Beginn wurde das in Lewy-Körperchen abgelagerte fibrilläre α -Synuclein als toxische Spezies betrachtet, während α -Synuclein-Oligomere lediglich als ein Zwischenprodukt der Synucleopathien galten. Übereinstimmend damit konnten krankhafte Veränderungen, induziert durch α -Synuclein-Oligomere, sowohl in neueren Studien als auch in der vorliegenden Studie gezeigt werden (Schmidt et al. 2012). Diese Arbeit zeigte den Einfluss der großen α -Synuclein-Oligomere (120mere) auf den Ca^{2+} -Haushalt und die damit einhergehende Toxizität. Im Gegensatz dazu konnten bei Applikation der kleinen Oligomere und Monomere weder Veränderungen in der synaptischen Transmission noch in der Ca^{2+} -Homöostase oder eine entstehende Toxizität nachgewiesen werden. Die Toxizität der großen Oligomere, D1 und E1, führt zu der Vermutung, dass die Ablagerung von α -Synuclein-Fibrillen in LK ein Schutzmechanismus ist.

Am Anfang der Synucleinopathie steht die Neuronenschädigung, die mit der Ausbildung der α -Synuclein-Oligomere korreliert und während des Krankheitsverlaufs fortschreitet. Wie es zu dieser Schädigung kommt, ist noch weitestgehend ungeklärt. Ein potentieller Krankheitsmechanismus toxischer α -Synuclein-Oligomere konnte in dieser Arbeit durch die vorgestellten Ergebnisse gezeigt werden. Hierbei konnte die Relevanz des Fe^{3+} für den Oligomerisierungsprozess von α -Synuclein zu porenbildenden Oligomeren und damit die Erhöhung der Ca^{2+} -Permeabilität belegt werden. Schlussfolgernd lassen sich für eine mögliche Therapie verschiedene Ansätze ableiten: der Knockout des α -Synucleins, die Reduktion der Symptome, der Wiederaufbau der Neurone und die Aggregationshemmung.

Durch die physiologische Funktion von α -Synuclein auf die synaptische Transmission lässt sich vermuten, dass ein kompletter Knockout des α -Synucleins zu einer verminderten Reizweiterleitung führen würde (Steidl et al. 2003). Die damit entstehende Dysfunktion führt wahrscheinlich zu einer Schädigung der neuronalen Bereiche und erscheint daher als Therapie problematisch.

Die momentan am häufigsten verwendete Therapieform, wie z. B die Verabreichung von L-

Dopa, basiert lediglich auf einer Reduktion der Symptome. Dies ermöglicht eine Verbesserung der Lebensqualität der Patienten und zögert das Fortschreiten der Krankheit hinaus, behebt aber nicht dessen Ursache.

Eine weitere Therapiemöglichkeit ist der Wiederaufbau der Neurone durch eine Implantation von Stammzellen. Hierbei werden gestörte Bereiche regeneriert, aber entstandene Störungen und Motorikverluste müssten jedoch bei Therapieerfolg wieder neu erlernt werden.

Weitaus viel versprechender sind vermutlich Ansätze, die eine Aggregation von α -Synuclein bzw. bereits dessen Konversion in die β -Faltblattstruktur verhindern. Dies soll sowohl über medikamentöse Behandlung als auch über α -Synuclein-Oligomer spezifische Antikörper erreicht werden. Letztere werden bereits in neueren Studien getestet, in denen Antikörper zur Aggregationshemmung von Proteinen wie α -Synuclein, APP, Huntington oder Prion etabliert werden (Southwell and Patterson 2010; Ladiwala et al. 2012; Southwell et al. 2012). Ebenfalls zeigten Wagner et al. (2013), dass sich auch durch medikamentöse Behandlungen die Aggregation unterdrücken lässt.

Ziel all dieser letzten Therapien ist es, den langsam aufsteigenden Krankheitsprozess zu unterbrechen, bevor das zentrale Nervensystem erheblich geschädigt wird. Gelänge es beispielsweise, den pathologischen Prozess bereits frühzeitig zu diagnostizieren und stünde darüber hinaus eine kausal wirksame Therapie zur Verfügung, könnte die folgenreiche Zerstörung der *Substantia nigra* und der Hirnrinde vermieden werden.

Hierfür ist noch weitere Grundlagenforschung notwendig. Diese Arbeit leistet durch das Verständnis des Oligomerisierungsprozesses und dessen Folgen auf Neurone einen wichtigen Beitrag für weiterführende Studien.

5 Zusammenfassung

Die α -Synuclein-Aggregation ist ein charakteristisches pathologisches Schlüsselereignis bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie Morbus Parkinson (MP) und Demenz mit Lewy-Körperchen (DLB). Neuere Untersuchungen weisen darauf hin, dass α -Synuclein-Oligomere die wesentliche neurotoxische Spezies darstellen. Der zugrundeliegende Mechanismus konnte dabei noch nicht vollständig geklärt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt verschiedener α -Synuclein-Oligomer-Präparationen auf die synaptische Übertragung in autaptischen neuronalen Kulturen untersucht. Applikationen von großen α -Synuclein-Oligomeren erhöhten selektiv die Amplitude von evozierten AMPA-Rezeptor-vermittelten synaptischen Strömen innerhalb von Minuten. Die Applikation von kleinen Oligomere erhöhte die Amplitude hingegen nicht. Die Amplituden der NMDA-Rezeptor-vermittelten synaptischen Ströme wurden von keiner der beiden Oligomerspezies beeinflusst. Die Biotinylierung von AMPA-Rezeptoren in akuten Hirnschnitten zeigte eine gesteigerte Rezeptorinsertion. Dies deutet auf einen postsynaptischen Mechanismus hin, bei dem die Ca^{2+} -Konzentration erhöht wird. Weiterhin konnte bei den großen α -Synuclein-Oligomeren eine Veränderung an der Präsynapse beobachtet werden. Sowohl die Frequenz der spontanen postsynaptischen Ströme (sEPSCs) in kultivierten Neuronen als auch die synaptische Vesikelausschüttung in Synaptosomenpräparationen wurden nach Applikation großer α -Synuclein-Oligomere erhöht. Um zu untersuchen, ob α -Synuclein-Oligomere, induziert durch die synaptische Transmission, einen Effekt auf das neuronale Überleben hatten, wurden MTT-Assays durchgeführt. Es konnte ein Anstieg der Glutamat-Toxizität in Gegenwart von großen α -Synuclein-Oligomeren gezeigt werden, was auf einen exzitatorischen Mechanismus im neuronalen Überleben hindeutet.

α -Synuclein aggregation is a characteristic pathological finding in neurogenerative diseases including Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies. Recent findings suggest that α -synuclein oligomers represent the principal neurotoxic species however their mode of action is not fully understood. Here we studied the effect of various well-defined oligomeric α -synuclein preparations on synaptic transmission in autaptic neuronal cultures. Preparations leading to large oligomers but not those leading to small ones were found to enhance selectivity of the amplitude of evoked AMPA receptor but not NMDA receptor-mediated synaptic currents within minutes. AMPA receptor biotinylation studies in acute brain slices reveal a postsynaptic mechanism namely an enhanced receptor insertion. In addition we obtained evidence that large synuclein oligomers do have a presynaptic action as well: Both

the frequency of spontaneous miniature synaptic current in cultured neurons as well as the synaptic vesicle release in synaptosomal preparations were enhanced following the application of α -synuclein oligomers. In order to work out if α -synuclein oligomer induced by enhanced excitatory synaptic transmission affect neuronal survival MTT assays were performed. Here we observed enhanced glutamate toxicity in the presence of large α -synuclein oligomers indicating that α -synuclein oligomers do alter neuronal survival via an excitotoxic mechanism.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Zitierte Literatur

- Abeliovich, H., Dunn, W. A., Jr., et al. (2000). "Dissection of autophagosome biogenesis into distinct nucleation and expansion steps." *J Cell Biol* **151**(5): 1025-1034.
- Aguzzi, A. and Haass, C. (2003). "Games played by rogue proteins in prion disorders and Alzheimer's disease." *Science* **302**(5646): 814-818.
- Aragon, S. R. and Pecora, R. (1975). "Fluorescence correlation spectroscopy and brownian rotational diffusion." *Biopolymers* **14**: 119-138.
- Arima, K., Ueda, K., et al. (1998). "NACP/alpha-synuclein immunoreactivity in fibrillary components of neuronal and oligodendroglial cytoplasmic inclusions in the pontine nuclei in multiple system atrophy." *Acta Neuropathol* **96**(5): 439-444.
- Babb, T. L., Ying, Z., et al. (1998). "Glutamate receptor mechanisms in human epileptic dysplastic cortex." *Epilepsy Res* **32**(1-2): 24-33.
- Bacia, K. and Schwille, P. (2003). "A dynamic view of cellular processes by in vivo fluorescence auto- and cross-correlation spectroscopy." *Methods* **29**(1): 74-85.
- Bashir, Z. I., Jane, D. E., et al. (1993). "Metabotropic glutamate receptors contribute to the induction of long-term depression in the CA1 region of the hippocampus." *Eur J Pharmacol* **239**(1-3): 265-266.
- Baumgartner, W., Golenhofen, N., et al. (2004). "Role of transglutaminase 1 in stabilisation of intercellular junctions of the vascular endothelium." *Histochem Cell Biol* **122**(1): 17-25.
- Beal, M. F. (1998). "Excitotoxicity and nitric oxide in Parkinson's disease pathogenesis." *Ann Neurol* **44**(3 Suppl 1): 110-114.
- Beattie, E. C., Carroll, R. C., et al. (2000). "Regulation of AMPA receptor endocytosis by a signaling mechanism shared with LTD." *Nat Neurosci* **3**(12): 1291-1300.
- Becker, G., Muller, A., et al. (2002). "Early diagnosis of Parkinson's disease." *J Neurol* **249**(3): 40-48.
- Bekkers, J. M. and Stevens, C. F. (1991). "Excitatory and inhibitory autaptic currents in isolated hippocampal neurons maintained in cell culture." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(17): 7834-7838.
- Berg, D. (2007). "Disturbance of iron metabolism as a contributing factor to SN hyperechogenicity in Parkinson's disease: implications for idiopathic and monogenetic forms." *Neurochem Res* **32**(10): 1646-1654.
- Betz, W. J. (1970). "Depression of transmitter release at the neuromuscular junction of the frog." *J Physiol* **206**(3): 629-644.
- Beyer, K. (2006). "Alpha-synuclein structure, posttranslational modification and alternative splicing as aggregation enhancers." *Acta Neuropathol* **112**(3): 237-251.
- Beyer, K. (2007). "Mechanistic aspects of Parkinson's disease: alpha-synuclein and the biomembrane." *Cell Biochem Biophys* **47**(2): 285-299.
- Bieschke, J., Weber, P., et al. (2004). "Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(33): 12207-12211.
- Biou, V., Bhattacharyya, S., et al. (2008). "Endocytosis and recycling of AMPA receptors lacking GluR2/3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(3): 1038-1043.
- Blackstone, C. and Sheng, M. (2002). "Postsynaptic calcium signaling microdomains in neurons." *Front Biosci* **7**: 872-885.
- Bliss, T. V. and Lomo, T. (1973). "Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path." *J Physiol* **232**(2): 331-356.
- Bootman, M. D., Lipp, P., et al. (2001). "The organisation and functions of local Ca(2+) signals." *J Cell Sci* **114**(12): 2213-2222.
- Braak, H., Sandmann-Keil, D., et al. (1999). "Extensive axonal Lewy neurites in Parkinson's disease: a novel pathological feature revealed by alpha-synuclein immunocytochemistry." *Neurosci Lett* **265**(1): 67-69.
- Bradbury, S. and Evennett, P. (1996). "Fluorescence microscopy, Contrast Techniques in Light Microscopy." *BIOS Scientific Publishers*.
- Bucciantini, M., Calloni, G., et al. (2004). "Prefibrillar amyloid protein aggregates share common

- features of cytotoxicity." *J Biol Chem* **279**(30): 31374-31382.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., et al. (2002). "Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases." *Nature* **416**(6880): 507-511.
- Budd, S. L. (1998). "Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation." *Pharmacol Ther* **80**(2): 203-229.
- Burnashev, N., Khodorova, A., et al. (1992). "Calcium-permeable AMPA-kainate receptors in fusiform cerebellar glial cells." *Science* **256**(5063): 1566-1570.
- Carafoli, E. (2005). "Calcium--a universal carrier of biological signals. Delivered on 3 July 2003 at the Special FEBS Meeting in Brussels." *FEBS J* **272**(5): 1073-1089.
- Carafoli, E. (2005). "The Symposia on Calcium Binding Proteins and Calcium Function in Health and Disease: an historical account, and an appraisal of their role in spreading the calcium message." *Cell Calcium* **37**(4): 279-281.
- Catts, S. V., Ward, P. B., et al. (1997). "Molecular biological investigations into the role of the NMDA receptor in the pathophysiology of schizophrenia." *Aust N Z J Psychiatry* **31**(1): 17-26.
- Caughey, B. and Lansbury, P. T. (2003). "Protofibrils, pores, fibrils, and neurodegeneration: separating the responsible protein aggregates from the innocent bystanders." *Annu Rev Neurosci* **26**: 267-298.
- Chandra, S., Gallardo, G., et al. (2005). "Alpha-synuclein cooperates with CSPalpha in preventing neurodegeneration." *Cell* **123**(3): 383-396.
- Cheng, F., Vivacqua, G., et al. (2011). "The role of alpha-synuclein in neurotransmission and synaptic plasticity." *J Chem Neuroanat* **42**(4): 242-248.
- Choi, D. W., Koh, J. Y., et al. (1988). "Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA antagonists." *J Neurosci* **8**(1): 185-196.
- Clayton, D. F. and George, J. M. (1999). "Synucleins in synaptic plasticity and neurodegenerative disorders." *J Neurosci Res* **58**(1): 120-129.
- Clements, J. D. and Bekkers, J. M. (1997). "Detection of spontaneous synaptic events with an optimally scaled template." *Biophys J* **73**(1): 220-229.
- Cole, N. B., Murphy, D. D., et al. (2005). "Metal-catalyzed oxidation of alpha-synuclein: helping to define the relationship between oligomers, protofibrils, and filaments." *J Biol Chem* **280**(10): 9678-9690.
- Collingridge, G. L., Kehl, S. J., et al. (1983). "Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus." *J Physiol* **334**: 33-46.
- Colton, R. J., Baselt, D. R., et al. (1997). "Scanning probe microscopy." *Curr Opin Chem Biol* **1**(3): 370-377.
- Constantine-Paton, M. (1994). "Effects of NMDA receptor antagonists on the developing brain." *Psychopharmacol Bull* **30**(4): 561-565.
- Conway, K. A., Lee, S. J., et al. (2000). "Accelerated oligomerization by Parkinson's disease linked alpha-synuclein mutants." *Ann N Y Acad Sci* **920**: 42-45.
- Danbolt, N. C. (2001). "Glutamate uptake." *Prog Neurobiol* **65**(1): 1-105.
- Danzer, K. M., Haasen, D., et al. (2007). "Different species of alpha-synuclein oligomers induce calcium influx and seeding." *J Neurosci* **27**(34): 9220-32.
- Davidson, W. S., Jonas, A., et al. (1998). "Stabilization of alpha-synuclein secondary structure upon binding to synthetic membranes." *J Biol Chem* **273**(16): 9443-9449.
- de Rijk, M. C., Rocca, W. A., et al. (1997). "A population perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease." *Neurology* **48**(5): 1277-1281.
- Demuro, A., Mina, E., et al. (2005). "Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers." *J Biol Chem* **280**(17): 17294-17300.
- Desplats, P., Lee, H. J., et al. (2009). "Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(31): 13010-13015.
- Dexter, D. T., Wells, F. R., et al. (1989). "Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease." *J Neurochem* **52**(6): 1830-186.
- Dickson, D. W., Ruan, D., et al. (1991). "Hippocampal degeneration differentiates diffuse Lewy body disease (DLBD) from Alzheimer's disease: light and electron microscopic immunocytochemistry of CA2-3 neurites specific to DLBD." *Neurology* **41**(9): 1402-1409.
- Diogenes, M. J., Dias, R. B., et al. (2012). "Extracellular alpha-synuclein oligomers modulate synaptic transmission and impair LTP via NMDA-receptor activation." *J Neurosci* **32**(34): 11750-

- 11762.
- Dirnagl, U., Iadecola, C., et al. (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." Trends Neurosci **22**(9): 391-397.
- Dowhan, W. (2009). "Molecular genetic approaches to defining lipid function." J Lipid Res **50** Suppl: 305-310.
- Dresbach, T., Qualmann, B., et al. (2001). "The presynaptic cytomatrix of brain synapses." Cell Mol Life Sci **58**(1): 94-116.
- Dudek, S. M. and Bear, M. F. (1992). "Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(10): 4363-4367.
- Ehrenberg, M. and Rigler, R. (1976). "Fluorescence correlation spectroscopy applied to rotational diffusion of macromolecules." Q Rev Biophys **9**(1): 69-81.
- Eigen, M. and Rigler, R. (1994). "Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(13): 5740-5747.
- El-Agnaf, O. M., Salem, S. A., et al. (2006). "Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease." FASEB J **20**(3): 419-425.
- Evers, S. and Obladen, M. (1994). "[Epidemiology and therapy of Parkinson disease in inpatient nursing homes]." Z Gerontol **27**(4): 270-5.
- Fearnley, J. M. and Lees, A. J. (1991). "Ageing and Parkinson's disease: substantia nigra regional selectivity." Brain **114**(5): 2283-2301.
- Fink, A. L. (2006). "The aggregation and fibrillation of alpha-synuclein." Acc Chem Res **39**(9): 628-634.
- Forman, M. S., Lee, V. M., et al. (2005). "Nosology of Parkinson's disease: looking for the way out of a quagmire." Neuron **47**(4): 479-482.
- Forno, L. S. (1996). "Neuropathology of Parkinson's disease." J Neuropathol Exp Neurol **55**(3): 259-272.
- Gaeta, A. and Hider, R. C. (2005). "The crucial role of metal ions in neurodegeneration: the basis for a promising therapeutic strategy." Br J Pharmacol **146**(8): 1041-1059.
- Gasser, T. (2003). "Overview of the genetics of parkinsonism." Adv Neurol **91**: 143-152.
- Giasson, B. I., Murray, I. V., et al. (2001). "A hydrophobic stretch of 12 amino acid residues in the middle of alpha-synuclein is essential for filament assembly." J Biol Chem **276**(4): 2380-2386.
- Giese, A., Bader, B., et al. (2005). "Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation." Biochem Biophys Res Commun **333**(4): 1202-1210.
- Giese, A., Bader, B., et al. (2005). "Single particle detection and characterization of synuclein co-aggregation." Biochem Biophys Res Commun **333**(4): 1202-10.
- Giese, A., Bieschke, J., et al. (2000). "Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases." Arch Virol Suppl(16): 161-171.
- Giese, A., Levin, J., et al. (2004). "Effect of metal ions on de novo aggregation of full-length prion protein." Biochem Biophys Res Commun **320**(4): 1240-1246.
- Glabe, C. G. (2008). "Structural classification of toxic amyloid oligomers." J Biol Chem **283**(44): 29639-29643.
- Goedert, M. (2001). "Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases." Nat Rev Neurosci **2**(7): 492-501.
- Goedert, M. (2001). "Parkinson's disease and other alpha-synucleinopathies." Clin Chem Lab Med **39**(4): 308-312.
- Goldberg, M. S. and Lansbury, P. T., Jr. (2000). "Is there a cause-and-effect relationship between alpha-synuclein fibrillization and Parkinson's disease?" Nat Cell Biol **2**(7): 115-119.
- Gorell, J. M., Johnson, C. C., et al. (1997). "Occupational exposures to metals as risk factors for Parkinson's disease." Neurology **48**(3): 650-658.
- Gosavi, N., Lee, H. J., et al. (2002). "Golgi fragmentation occurs in the cells with prefibrillar alpha-synuclein aggregates and precedes the formation of fibrillar inclusion." J Biol Chem **277**(50): 48984-48992.
- Gotz, M. E., Double, K., et al. (2004). "The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease." Ann N Y Acad Sci **1012**: 193-208.
- Gureviciene, I., Gurevicius, K., et al. (2007). "Role of alpha-synuclein in synaptic glutamate release."

- Neurobiol Dis **28**(1): 83-89.
- Haass, C. and Selkoe, D. J. (2007). "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 101-112.
- Hardy, J. and Selkoe, D. J. (2002). "The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics." Science **297**(5580): 353-356.
- Hasegawa, T., Matsuzaki, M., et al. (2004). "Accelerated alpha-synuclein aggregation after differentiation of SH-SY5Y neuroblastoma cells." Brain Res **1013**(1): 51-59.
- Hashimoto, M. and Masliah, E. (1999). "Alpha-synuclein in Lewy body disease and Alzheimer's disease." Brain Pathol **9**(4): 707-720.
- Herb, A., Burnashev, N., et al. (1992). "The KA-2 subunit of excitatory amino acid receptors shows widespread expression in brain and forms ion channels with distantly related subunits." Neuron **8**(4): 775-785.
- Hestrin, S. (1993). "Different glutamate receptor channels mediate fast excitatory synaptic currents in inhibitory and excitatory cortical neurons." Neuron **11**(6): 1083-1091.
- Högen, T. (2009). Einzelmolekülanalyse von eiseninduzierten, porenbildenden α -Synucleinoligomeren: Von der molekularen Pathologie zur kausalen Therapie. Medizinischen Fakultät, LMU München.
- Högen, T., Levin, J., et al. (2012). "Two different binding modes of alpha-synuclein to lipid vesicles depending on its aggregation state." Biophys J **102**(7): 1646-1655.
- Hollmann, T. J., Haviland, D. L., et al. (1998). "Cloning, expression, sequence determination, and chromosome localization of the mouse complement C3a anaphylatoxin receptor gene." Mol Immunol **35**(3): 137-148.
- Hume, R. I., Dingledine, R., et al. (1991). "Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability." Science **253**(5023): 1028-1031.
- Hungerhuber, E. (2003). Neuroprotektion bei fokaler zerebraler Ischämie. Medizinische Fakultät, LMU München.
- Ibanez, P., Bonnet, A. M., et al. (2004). "Causal relation between alpha-synuclein gene duplication and familial Parkinson's disease." Lancet **364**(9440): 1169-1171.
- Irizarry, M. C., Growdon, W., et al. (1998). "Nigral and cortical Lewy bodies and dystrophic nigral neurites in Parkinson's disease and cortical Lewy body disease contain alpha-synuclein immunoreactivity." J Neuropathol Exp Neurol **57**(4): 334-337.
- Iwai, A., Masliah, E., et al. (1995). "The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system." Neuron **14**(2): 467-475.
- Jakes, R., Spillantini, M. G., et al. (1994). "Identification of two distinct synucleins from human brain." FEBS Lett **345**(1): 27-32.
- Jellinger, K. A. (1996). "The neuropathologic diagnosis of secondary parkinsonian syndromes." Adv Neurol **69**: 293-303.
- Jellinger, K. A. (2002). "Recent developments in the pathology of Parkinson's disease." J Neural Transm Suppl(62): 347-376.
- Jellinger, K. A. (2003). "Neuropathological spectrum of synucleinopathies." Mov Disord **18**(6): 2-12.
- Jenco, J. M., Rawlingson, A., et al. (1998). "Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins." Biochemistry **37**(14): 4901-4909.
- Jenner, P. and Olanow, C. W. (2006). "The pathogenesis of cell death in Parkinson's disease." Neurology **66**(10 Suppl 4): 24-36.
- Ji, H., Liu, Y. E., et al. (1997). "Identification of a breast cancer-specific gene, BCSG1, by direct differential cDNA sequencing." Cancer Res **57**(4): 759-764.
- Jones, M. V. and Westbrook, G. L. (1996). "The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission." Trends Neurosci **19**(3): 96-101.
- Kahle, P. J., Haass, C., et al. (2002). "Structure/function of alpha-synuclein in health and disease: rational development of animal models for Parkinson's and related diseases." J Neurochem **82**(3): 449-457.
- Kahle, P. J., Neumann, M., et al. (2000). "Subcellular localization of wild-type and Parkinson's disease-associated mutant alpha-synuclein in human and transgenic mouse brain." J Neurosci **20**(17): 6365-6373.

- Kahle, P. J., Neumann, M., et al. (2002). "Hyperphosphorylation and insolubility of alpha-synuclein in transgenic mouse oligodendrocytes." EMBO Rep **3**(6): 583-588.
- Kamp, F. and Beyer, K. (2006). "Binding of alpha-synuclein affects the lipid packing in bilayers of small vesicles." J Biol Chem **281**(14): 9251-9259.
- Kandel, E., Schwartz, J., et al. (1991). "Principles of neuroscience." New York: Elsevier Publishing Co.
- Kask, P., Palo, K., et al. (1999). "Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13756-13761.
- Katz, B. and Miledi, R. (1968). "Localized blockage of nerve impulses at the myoneural junction." J Physiol **197**(1): 7.
- Kaur, D., Peng, J., et al. (2007). "Increased murine neonatal iron intake results in Parkinson-like neurodegeneration with age." Neurobiol Aging **28**(6): 907-913.
- Kaur, D., Yantiri, F., et al. (2003). "Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity in vivo: a novel therapy for Parkinson's disease." Neuron **37**(6): 899-909.
- Kayed, R. and Glabe, C. G. (2006). "Conformation-dependent anti-amyloid oligomer antibodies." Methods Enzymol **413**: 326-344.
- Kayed, R., Head, E., et al. (2007). "Fibril specific, conformation dependent antibodies recognize a generic epitope common to amyloid fibrils and fibrillar oligomers that is absent in prefibrillar oligomers." Mol Neurodegener **2**: 18.
- Kayed, R., Sokolov, Y., et al. (2004). "Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases." J Biol Chem **279**(45): 46363-46366.
- Kew, J. N., Pflimlin, M. C., et al. (2002). "Differential regulation of synaptic transmission by mGlu2 and mGlu3 at the perforant path inputs to the dentate gyrus and CA1 revealed in mGlu2 $-/-$ mice." Neuropharmacology **43**(2): 215-221.
- Kinne, A. (2011). Studien zum Transport von Schilddrüsenhormonen durch Membrantransporter der MCT- und LAT-Familie. Medizinische Fakultät, Charité Berlin.
- Kleckner, N. W. and Dingledine, R. (1988). "Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes." Science **241**(4867): 835-837.
- Koh, D. S., Geiger, J. R., et al. (1995). "Ca²⁺-permeable AMPA and NMDA receptor channels in basket cells of rat hippocampal dentate gyrus." J Physiol **485**(2): 383-402.
- Koltchine, V. V., Anantharam, V., et al. (1996). "Alternative splicing of the NMDAR1 subunit affects modulation by calcium." Brain Res Mol Brain Res **39**(1-2): 99-108.
- Konnerth, A., Keller, B. U., et al. (1990). "Patch clamp analysis of excitatory synapses in mammalian spinal cord slices." Pflugers Arch **417**(3): 285-290.
- Koo, E. H., Lansbury, P. T., Jr., et al. (1999). "Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(18): 9989-9990.
- Kornhuber, J. and Weller, M. (1997). "Psychotogenicity and N-methyl-D-aspartate receptor antagonism: implications for neuroprotective pharmacotherapy." Biol Psychiatry **41**(2): 135-144.
- Kostka, M., Hogen, T., et al. (2008). "Single particle characterization of iron-induced pore-forming alpha-synuclein oligomers." J Biol Chem **283**(16): 10992-11003.
- Kraepelin, E. (1910). "Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte." Barth Verlag, Leipzig **8. Auflage.**
- Kramer, M. L. and Schulz-Schaeffer, W. J. (2007). "Presynaptic alpha-synuclein aggregates, not Lewy bodies, cause neurodegeneration in dementia with Lewy bodies." J Neurosci **27**(6): 1405-1410.
- Kruger, R., Kuhn, W., et al. (1998). "Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease." Nat Genet **18**(2): 106-108.
- Ladiwala, A. R., Litt, J., et al. (2012). "Conformational differences between two amyloid beta oligomers of similar size and dissimilar toxicity." J Biol Chem **287**(29): 24765-24773.
- Lang, A. E. and Lozano, A. M. (1998). "Parkinson's disease. First of two parts." N Engl J Med **339**(15): 1044-1053.
- Larsen, K. E., Schmitz, Y., et al. (2006). "Alpha-synuclein overexpression in PC12 and chromaffin cells impairs catecholamine release by interfering with a late step in exocytosis." J Neurosci

- 26(46): 11915-11922.
- Lashuel, H. A. and Lansbury, P. T., Jr. (2006). "Are amyloid diseases caused by protein aggregates that mimic bacterial pore-forming toxins?" *Q Rev Biophys* **39**(2): 167-201.
- Lashuel, H. A., Petre, B. M., et al. (2002). "Alpha-synuclein, especially the Parkinson's disease-associated mutants, forms pore-like annular and tubular protofibrils." *J Mol Biol* **322**(5): 1089-1102.
- Lavedan, C. (1998). "The synuclein family." *Genome Res* **8**(9): 871-880.
- Lavedan, C., Leroy, E., et al. (1998). "Identification, localization and characterization of the human gamma-synuclein gene." *Hum Genet* **103**(1): 106-112.
- Lee, F. J., Liu, F., et al. (2001). "Direct binding and functional coupling of alpha-synuclein to the dopamine transporters accelerate dopamine-induced apoptosis." *FASEB J* **15**(6): 916-926.
- Lee, H. J., Choi, C., et al. (2002). "Membrane-bound alpha-synuclein has a high aggregation propensity and the ability to seed the aggregation of the cytosolic form." *J Biol Chem* **277**(1): 671-678.
- Lee, H. J., Patel, S., et al. (2005). "Intravesicular localization and exocytosis of alpha-synuclein and its aggregates." *J Neurosci* **25**(25): 6016-6024.
- Levin, J., Bertsch, U., et al. (2005). "Single particle analysis of manganese-induced prion protein aggregates." *Biochem Biophys Res Commun* **329**(4): 1200-1207.
- Lindersson, E., Beedholm, R., et al. (2004). "Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers." *J Biol Chem* **279**(13): 12924-12934.
- Liu, S., Ninan, I., et al. (2004). "alpha-Synuclein produces a long-lasting increase in neurotransmitter release." *EMBO J* **23**(22): 4506-4516.
- Lowe, J. (1998). "Establishing a pathological diagnosis in degenerative dementias." *Brain Pathol* **8**(2): 403-406.
- MacDermott, A. B., Role, L. W., et al. (1999). "Presynaptic ionotropic receptors and the control of transmitter release." *Annu Rev Neurosci* **22**: 443-485.
- Magde, D., Elson, E. L., et al. (1974). "Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization." *Biopolymers* **13**(1): 29-61.
- Malenka, R. C. and Bear, M. F. (2004). "LTP and LTD: an embarrassment of riches." *Neuron* **44**(1): 5-21.
- Manahan-Vaughan, D. and Reymann, K. G. (1997). "Group 1 metabotropic glutamate receptors contribute to slow-onset potentiation in the rat CA1 region in vivo." *Neuropharmacology* **36**(11-12): 1533-1538.
- Maroteaux, L., Campanelli, J. T., et al. (1988). "Synuclein: a neuron-specific protein localized to the nucleus and presynaptic nerve terminal." *J Neurosci* **8**(8): 2804-2815.
- Marti, M. J., Tolosa, E., et al. (2003). "Clinical overview of the synucleinopathies." *Mov Disord* **18**(6): 21-27.
- Martin, L. J., Pan, Y., et al. (2006). "Parkinson's disease alpha-synuclein transgenic mice develop neuronal mitochondrial degeneration and cell death." *J Neurosci* **26**(1): 41-50.
- Martin, P. D. and Shapiro, M. L. (2000). "Disparate effects of long-term potentiation on evoked potentials and single CA1 neurons in the hippocampus of anesthetized rats." *Hippocampus* **10**(3): 207-212.
- Maslah, E., Westland, C. E., et al. (1997). "Amyloid precursor proteins protect neurons of transgenic mice against acute and chronic excitotoxic injuries in vivo." *Neuroscience* **78**(1): 135-146.
- Mayer, M. L. and Westbrook, G. L. (1987). "Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones." *J Physiol* **394**: 501-527.
- McLean, P. J. and Hyman, B. T. (2002). "An alternatively spliced form of rodent alpha-synuclein forms intracellular inclusions in vitro: role of the carboxy-terminus in alpha-synuclein aggregation." *Neurosci Lett* **323**(3): 219-223.
- McLean, P. J., Ribich, S., et al. (2000). "Subcellular localization of alpha-synuclein in primary neuronal cultures: effect of missense mutations." *J Neural Transm Suppl*(58): 53-63.
- Mennerick, S. and Zorumski, C. F. (1995). "Paired-pulse modulation of fast excitatory synaptic currents in microcultures of rat hippocampal neurons." *J Physiol* **488**(1): 85-101.
- Michaeli, S., Oz, G., et al. (2007). "Assessment of brain iron and neuronal integrity in patients with Parkinson's disease using novel MRI contrasts." *Mov Disord* **22**(3): 334-340.

- Mizuno, Y., Hattori, N., et al. (2008). "Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **363**(1500): 2215-2227.
- Mollenhauer, B., Trenkwalder, C., et al. (2006). "Beta-amyloid 1-42 and tau-protein in cerebrospinal fluid of patients with Parkinson's disease dementia." Dement Geriatr Cogn Disord **22**(3): 200-208.
- Monyer, H., Seeburg, P. H., et al. (1991). "Glutamate-operated channels: developmentally early and mature forms arise by alternative splicing." Neuron **6**(5): 799-810.
- Morhagen, K. (2000). Räumliche Verteilung von Kalziumsignalen in Bergmanngliazellen als Antwort auf neuronale Aktivität. Medizinischen Fakultät, Charité der Humboldt-Universität zu Berlin.
- Muchowski, P. J. (2002). "Protein misfolding, amyloid formation, and neurodegeneration: a critical role for molecular chaperones?" Neuron **35**(1): 9-12.
- Munishkina, L. A., Henriques, J., et al. (2004). "Role of protein-water interactions and electrostatics in alpha-synuclein fibril formation." Biochemistry **43**(11): 3289-3300.
- Nakajo, S., Shioda, S., et al. (1994). "Localization of phosphoneuroprotein 14 (PNP 14) and its mRNA expression in rat brain determined by immunocytochemistry and in situ hybridization." Brain Res Mol Brain Res **27**(1): 81-66.
- Nakamura, K. "alpha-Synuclein and mitochondria: partners in crime?" Neurotherapeutics **10**(3): 391-399.
- Neher, E. and Sakmann, B. (1976). "Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres." Nature **260**(5554): 799-802.
- Numberger, M. and Draguhn, A. (1996). "Patch-Clamp-Technik." Spektrum Akademischer Verlag Auflage: 1
- Nuscher, B., Kamp, F., et al. (2004). "Alpha-synuclein has a high affinity for packing defects in a bilayer membrane: a thermodynamics study." J Biol Chem **279**(21): 21966-21975.
- Oakley, A. E., Collingwood, J. F., et al. (2007). "Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease." Neurology **68**(21): 1820-185.
- Okochi, M., Walter, J., et al. (2000). "Constitutive phosphorylation of the Parkinson's disease associated alpha-synuclein." J Biol Chem **275**(1): 390-397.
- Ostrerova, N., Petrucelli, L., et al. (1999). "alpha-Synuclein shares physical and functional homology with 14-3-3 proteins." J Neurosci **19**(14): 5782-5791.
- Ostrerova-Golts, N., Petrucelli, L., et al. (2000). "The A53T alpha-synuclein mutation increases iron-dependent aggregation and toxicity." J Neurosci **20**(16): 6048-6054.
- Pellegrini-Giampietro, D. E., Gorter, J. A., et al. (1997). "The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca(2+)-permeable AMPA receptors in neurological disorders." Trends Neurosci **20**(10): 464-470.
- Petrovic, M., Horak, M., et al. (2005). "Physiology and pathology of NMDA receptors." Prague Med Rep **106**(2): 113-136.
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., et al. (1997). "Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease." Science **276**(5321): 2045-2047.
- Pountney, D. L., Lowe, R., et al. (2004). "Annular alpha-synuclein species from purified multiple system atrophy inclusions." J Neurochem **90**(2): 502-512.
- Priller, C. (2006). Funktion des Amyloid Precursor Proteins und dessen Spaltprodukten bei der synaptischen Übertragung. Fakultät für Chemie und Pharmazie, LMU München.
- Pronin, A. N., Morris, A. J., et al. (2000). "Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases." J Biol Chem **275**(34): 26515-26522.
- Recchia, A., Debetto, P., et al. (2004). "Alpha-synuclein and Parkinson's disease." FASEB J **18**(6): 617-626.
- Ross, C. A. and Poirier, M. A. (2004). "Protein aggregation and neurodegenerative disease." Nat Med **10**: 10-17.
- Sanchez, I., Mahlke, C., et al. (2003). "Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders." Nature **421**(6921): 373-379.
- Schmidt, F., Levin, J., et al. (2012). "Single-channel electrophysiology reveals a distinct and uniform pore complex formed by alpha-synuclein oligomers in lipid membranes." PLoS One **7**(8): 42545.
- Schmitz, D., Mellor, J., et al. (2001). "Presynaptic kainate receptor mediation of frequency facilitation at hippocampal mossy fiber synapses." Science **291**(5510): 1972-1976.
- Scholz, K. P. and Byrne, J. H. (1987). "Long-term sensitization in Aplysia: biophysical correlates in

- tail sensory neurons." Science **235**(4789): 685-687.
- Schwille, P., Bieschke, J., et al. (1997). "Kinetic investigations by fluorescence correlation spectroscopy: the analytical and diagnostic potential of diffusion studies." Biophys Chem **66**(2-3): 211-228.
- Schwille, P., Meyer-Almes, F. J., et al. (1997). "Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution." Biophys J **72**(4): 1878-1886.
- Scoville, W. B. and Milner, B. (1957). "Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions." J Neurol Neurosurg Psychiatry **20**(1): 11-21.
- Seeburg, P. H. (1993). "The TiPS/TINS lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels." Trends Pharmacol Sci **14**(8): 297-303.
- Serpell, L. C., Berriman, J., et al. (2000). "Fiber diffraction of synthetic alpha-synuclein filaments shows amyloid-like cross-beta conformation." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4897-4902.
- Shachar, D. B., Kahana, N., et al. (2004). "Neuroprotection by a novel brain permeable iron chelator, VK-28, against 6-hydroxydopamine lesion in rats." Neuropharmacology **46**(2): 254-463.
- Sharon, R., Bar-Joseph, I., et al. (2003). "The formation of highly soluble oligomers of alpha-synuclein is regulated by fatty acids and enhanced in Parkinson's disease." Neuron **37**(4): 583-595.
- Singleton, A. B., Farrer, M., et al. (2003). "alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease." Science **302**(5646): 841.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., et al. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem **150**(1): 76-85.
- Sommer, B., Keinänen, K., et al. (1990). "Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels of the CNS." Science **249**(4976): 1580-1585.
- Soto, C. (2003). "Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases." Nat Rev Neurosci **4**(1): 49-60.
- Southwell, A. L. and Patterson, P. H. (2010). "Antibody therapy in neurodegenerative disease." Rev Neurosci **21**(4): 273-287.
- Southwell, A. L., Skotte, N. H., et al. (2012). "Antisense oligonucleotide therapeutics for inherited neurodegenerative diseases." Trends Mol Med **18**(11): 634-643.
- Spillantini, M. G., Crowther, R. A., et al. (1998). "Filamentous alpha-synuclein inclusions link multiple system atrophy with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies." Neurosci Lett **251**(3): 205-208.
- Spillantini, M. G., Divane, A., et al. (1995). "Assignment of human alpha-synuclein (SNCA) and beta-synuclein (SNCB) genes to chromosomes 4q21 and 5q35." Genomics **27**(2): 379-381.
- Spillantini, M. G. and Goedert, M. (2000). "The alpha-synucleinopathies: Parkinson's disease, dementia with Lewy bodies, and multiple system atrophy." Ann N Y Acad Sci **920**: 16-27.
- Steidl, J. V., Gomez-Isla, T., et al. (2003). "Altered short-term hippocampal synaptic plasticity in mutant alpha-synuclein transgenic mice." Neuroreport **14**(2): 219-223.
- Surguchov, A., Surgucheva, I., et al. (1999). "Synoretin--A new protein belonging to the synuclein family." Mol Cell Neurosci **13**(2): 95-103.
- Swanson, G. T., Feldmeyer, D., et al. (1996). "Effect of RNA editing and subunit co-assembly single-channel properties of recombinant kainate receptors." J Physiol **492**(1): 129-142.
- Takeda, A., Mallory, M., et al. (1998). "Abnormal accumulation of NACP/alpha-synuclein in neurodegenerative disorders." Am J Pathol **152**(2): 367-372.
- Tanaka, Y., Engelender, S., et al. (2001). "Inducible expression of mutant alpha-synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis." Hum Mol Genet **10**(9): 919-26.
- Tofaris, G. K., Revesz, T., et al. (2007). "Adult-onset neurodegeneration with brain iron accumulation and cortical alpha-synuclein and tau pathology: a distinct clinicopathological entity." Arch Neurol **64**(2): 280-282.
- Tofaris, G. K. and Spillantini, M. G. (2005). "Alpha-synuclein dysfunction in Lewy body diseases." Mov Disord **20**(12): 37-44.
- Tosatto, L., Andrichetti, A. O., et al. (2012). "Alpha-synuclein pore forming activity upon membrane association." Biochim Biophys Acta **1818**(11): 2876-2883.

- Trojanowski, J. Q., Goedert, M., et al. (1998). "Fatal attractions: abnormal protein aggregation and neuron death in Parkinson's disease and Lewy body dementia." Cell Death Differ **5**(10): 832-837.
- Tsigelny, I. F., Bar-On, P., et al. (2007). "Dynamics of alpha-synuclein aggregation and inhibition of pore-like oligomer development by beta-synuclein." FEBS J **274**(7): 1862-1877.
- Ueda, K., Fukushima, H., et al. (1993). "Molecular cloning of cDNA encoding an unrecognized component of amyloid in Alzheimer disease." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(23): 11282-11286.
- Uversky, V. N. (2007). "Neuropathology, biochemistry, and biophysics of alpha-synuclein aggregation." J Neurochem **103**(1): 17-37.
- Uversky, V. N., Li, J., et al. (2001). "Evidence for a partially folded intermediate in alpha-synuclein fibril formation." J Biol Chem **276**(14): 10737-10744.
- Uversky, V. N., Li, J., et al. (2001). "Metal-triggered structural transformations, aggregation, and fibrillation of human alpha-synuclein. A possible molecular NK between Parkinson's disease and heavy metal exposure." J Biol Chem **276**(47): 44284-44296.
- Uversky, V. N., Li, J., et al. (2002). "Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of alpha-synuclein assembly by beta- and gamma-synucleins." J Biol Chem **277**(14): 11970-11978.
- Vandenberg, R. J. (1998). "Molecular pharmacology and physiology of glutamate transporters in the central nervous system." Clin Exp Pharmacol Physiol **25**(6): 393-400.
- Verdoorn, T. A., Burnashev, N., et al. (1991). "Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels." Science **252**(5013): 1715-1718.
- Volles, M. J. and Lansbury, P. T., Jr. (2002). "Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein is sensitive to Parkinson's disease-linked mutations and occurs by a pore-like mechanism." Biochemistry **41**(14): 4595-4602.
- Volles, M. J., Lee, S. J., et al. (2001). "Vesicle permeabilization by protofibrillar alpha-synuclein: implications for the pathogenesis and treatment of Parkinson's disease." Biochemistry **40**(26): 7812-7819.
- von Campenhausen, S., Bornschein, B., et al. (2005). "Prevalence and incidence of Parkinson's disease in Europe." Eur Neuropsychopharmacol **15**(4): 473-490.
- Watson, J. B., Hatami, A., et al. (2009). "Alterations in corticostriatal synaptic plasticity in mice overexpressing human alpha-synuclein." Neuroscience **159**(2): 501-513.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969). "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." J Biol Chem **244**(16): 4406-4412.
- Winkler, T., Kettling, U., et al. (1999). "Confocal fluorescence coincidence analysis: an approach to ultra high-throughput screening." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(4): 1375-1378.
- Winklhofer, K. F., Tatzelt, J., et al. (2008). "The two faces of protein misfolding: gain- and loss-of-function in neurodegenerative diseases." EMBO J **27**(2): 336-349.
- Wood, S. J., Wypych, J., et al. (1999). "alpha-synuclein fibrillogenesis is nucleation-dependent. Implications for the pathogenesis of Parkinson's disease." J Biol Chem **274**(28): 19509-19512.
- Yavich, L., Tanila, H., et al. (2004). "Role of alpha-synuclein in presynaptic dopamine recruitment." J Neurosci **24**(49): 11165-11170.
- Zarranz, J. J., Alegre, J., et al. (2004). "The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia." Ann Neurol **55**(2): 164-173.
- Zayed, J., Ducic, S., et al. (1990). "Environmental factors in the etiology of Parkinson's disease." Can J Neurol Sci **17**(3): 286-291.
- Zecca, L., Youdim, M. B., et al. (2004). "Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders." Nat Rev Neurosci **5**(11): 863-873.
- Zhang, X., Xie, W., et al. (2005). "Neuroprotection by iron chelator against proteasome inhibitor-induced nigral degeneration." Biochem Biophys Res Commun **333**(2): 544-549.
- Zucker, R. S. (1989). "Short-term synaptic plasticity." Annu Rev Neurosci **12**: 13-31.
- Zucker, R. S. and Regehr, W. G. (2002). "Short-term synaptic plasticity." Annu Rev Physiol **64**: 355-405.

6.2 Eigene Literatur:

Selective activation of adenosine A2A receptors on immune cells by a CD73-dependent prodrug suppresses joint inflammation in experimental rheumatoid arthritis.

Flögel U, Burghoff S, van Lent PL, Temme S, Galbarz L, Ding Z, El-Tayeb A, Huels S, Bönner F, Borg N, Jacoby C, Müller CE, van den Berg WB, Schrader J.
Sci Transl Med. 2012;4(146)

Extracellular purine metabolism and signaling of CD73-derived adenosine in murine Treg and Teff cells.

Romio M, Reinbeck B, Bongardt S, Hüls S, Burghoff S, Schrader J.
Am J Physiol Cell Physiol. 2011;301(2):C530-9.

AMPA-receptor-mediated excitatory synaptic transmission is enhanced by iron-induced α -Synuclein oligomers.

Hüls S, Högen T, Vassallo N, Danzer KM, Hengerer B, Giese A, Herms J.
J Neurochem. 2011 Jun;117(5):868-878.

Excitatory synaptic transmission is depressed in cultured hippocampal neurons of APP/PS1 mice.

Priller C, Mitteregger G, Paluch S, Vassallo N, Staufienbiel M, Kretzschmar HA, Jucker M, Herms J., Neurobiol Aging. 2007.

Cellular prion protein modulates the intracellular calcium response to hydrogen peroxide.

Krebs B, Wiebelitz A, Balitzki-Korte B, Vassallo N, Paluch S, Mitteregger G, Onodera T, Kretzschmar HA, Herms J., J Neurochem. 2007;100(2):358-67.

Mutant presenilin 1 alters synaptic transmission in cultured hippocampal neurons.

Priller C, Dewachter I, Vassallo N, Paluch S, Pace C, Kretzschmar HA, Van Leuven F, Herms J. J Biol Chem. 2007;282(2):1119-1127.

Reduction of Fe(III) ions complexed to physiological ligands by lipoyl dehydrogenase and other flavoenzymes in vitro: implications for an enzymatic reduction of Fe(III) ions of the labile iron pool.

Petrat F, Paluch S, Dogruöz E, Dörfler P, Kirsch M, Korth HG, Sustmann R, de Groot H.
J Biol Chem. 2003;278(47):46403-46413.

7 Danksagung

Als Erstes möchte ich Prof. Dr. Jochen Herms für das Thema und die Betreuung dieser Arbeit danken. Durch die vielen kritischen und lehrreichen Gespräche, wurde nicht nur dieses Projekt realisiert, sondern ich habe methodisch, praktisch und theoretisch mehr gelernt, als ich je erhoffen durfte. Vielen Dank für die Unterstützung und Geduld in all den Jahren.

Herrn Prof. Dr. Martin Biel danke ich ausdrücklich für seine Bereitschaft, diese Promotion zu betreuen und zu begutachten und für seine Hilfe in manch kritischen Fragen.

Doris Schechinger und Christina Priller danke ich für die Einführung in die Zellkultur sowie der Patch-Clamp-Technik. Besonders Christina danke ich für die Bereitschaft auch später noch für meine Fragen offen zu sein.

Bei Prof. Dr. Bastian Hengerer und Karin Danzer bedanke ich mich für die Kooperation und die fachlichen Diskussionen. Insbesondere Prof. Dr. Hengerer danke ich für die Unterstützung und Möglichkeit eigene Ideen zu erarbeiten.

Ein großer Dank gebührt auch meinem weiteren Betreuer Prof. Dr. Armin Giese und seiner ganzen Arbeitsgruppe. Er gab mir die Möglichkeit, nicht nur seine Forschungseinrichtungen zu verwenden, sondern nahm mich auch als zusätzliches Mitglied seiner Gruppe auf. Durch die anregenden Diskussionen meiner Daten mit Tobias Högen, Jens Wagner, Felix Schmid und Johannes Levin wurde manche neue Idee geboren. Vielen Dank Tobias für die Zusammenarbeit und das Teilen deines Wissens.

Für die kritische Durchsicht der Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bei Martin Fuhrmann, Tobias Högen, Marion Hüls, Silke Weidmann und ganz besonders bei Frau Dr. Bartenstein bedanken. Natürlich auch bei allen anderen, welche immer wieder geholfen haben und mir Anregungen gaben.

Für die nette Zusammenarbeit und freundliche Arbeitsatmosphäre im Labor danke ich Martin Fuhrmann, Yvonne Kienast, Christina Priller, Tobias Bittner, Tobias Högen und Kamran Hornejad, Carola Eggert, Christian Jung und Steffen Burghold. Martin, Dir gebührt noch ein spezieller Dank, für all die Hilfe bei Problemen jeglicher Art.

Für die tolle Zusammenarbeit im ganzen Haus danke ich nicht zuletzt Peer Schmitz, Kathrin Dittmar, Janina Mielke, Sabina Eigenbrodt, Brigitte Kraft, Michael Ruiter und Anna Krieger und allen anderen.

Als einige der wichtigsten Personen danke ich den Tierärzten und Tierpflegern im ZNP. Ohne Euch und Eure Unterstützung, hätte ich das alles nie geschafft. Danke Gerda Mitteregger-Kretschmar für die Hilfe bei allen Tierfragen und das du so unkompliziert und immer schnell geholfen hast.

Ich danke meinen Eltern, die mir die Chance gegeben haben, dies zu verwirklichen und leider beide nicht mehr dabei sein können. Außerdem meinem Onkel Horst, der mich immer in seiner ruhigen Art unterstützt hat. Ganz besonders danke ich meinem Mann, der immer an mich geglaubt hat und mit seiner Geduld und Ruhe immer für mich da war.